



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Estudo Computacional-Experimental do  
Comportamento Oscilatório em  
Fermentações Contínuas com  
*Zymomonas mobilis*.**

**Anna Carolina Rapôso Camêlo**

Recife-PE  
Fevereiro, 2004

Anna Carolina Rapôso Camêlo

**Estudo Computacional-Experimental do  
Comportamento Oscilatório em  
Fermentações Contínuas com  
*Zymomonas mobilis*.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadores: Prof<sup>o</sup>. Dr. Carlos Edison Lopes

Prof<sup>o</sup>. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro

Universidade Federal de Pernambuco

Recife

Departamento de Engenharia Química da UFPE  
2004

Dissertação de mestrado defendida e aprovada em 18 de fevereiro de 2004 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:

---

Prof. Dr. Carlos Edison Lopes  
Departamento de Antibióticos - UFPE

---

Prof. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro  
Departamento de Antibióticos - UFPE

---

Prof. Dr. Maurício Bezerra de Souza Junior  
Escola de Química - UFRJ

---

Profª Dra. Maria Los Angeles Perez Fernandez Palha  
Departamento de Engenharia Química - UFPE

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão,  
Milton José Camêlo, Maria José Rapôso Camêlo  
e André Frederico Rapôso Camêlo, pelo amor,  
dedicação e formação do meu ser.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família, que sem eles eu não seria o que sou hoje.

A Lucas Salgado Cole pelo companheiro, compreensão, amizade e amor e a Eduardo Cole, Ana Carmem Salgado Cole, Bruno Salgado Cole e Leonardo Cole Neto, por terem sido meus amigos e pelo amor existente entre nós.

Aos meus queridos orientadores e amigos Carlos Edison Lopes e Irapuan Oliveira Pinheiro, pelos ensinamentos, conversas, incentivo e dedicação deste trabalho.

Aos queridos mestres e amigos Alfredo Arnóbio da Gama e a Maria Los Angeles Palha, por terem sido os maiores incentivadores na minha busca pelo crescimento profissional.

À minha amiga do mestrado Tatiana, por todos os momentos vividos e dedicados em conjunto.

Ao Prof. José Otamar Falcão de Moraes, por ter cedido gentilmente as cepas de *Zymomonas mobilis*,

Aos meus amigos eternos, Ana Cristina, Eduardo Laureano, Paulo Roberto, Idevan Júnior, Niara, Renata, Thays, Geysa, Pedrinho, Paulo Negão e Tom por todo incentivo, carinho e amizade.

Às novas amigas Christine, Emanuelle e Marcela, do Departamento de Antibióticos, pelas conversas, pela amizade e pela dura rotina dividida durante um ano.

Aos colegas do Departamento de Antibióticos: Adriana, Rita, Cynthia Souza, Cíntia, Danilo, Vanda, Orlando, André Lacerda, Claudemir, André Coelho, Edélvio.

Ao Departamento de Engenharia Química e de Antibióticos da UFPE por todo apoio e estrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

A *Capex*, pelo suporte financeiro durante todo desenvolvimento deste trabalho

“... eu sou mameluco, sou de Casa Forte, sou de Pernambuco, eu sou Leão do Norte...”

Lenine

## SUMÁRIO

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Epígrafe	vi
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. <i>Zymomonas mobilis</i>	05
2.2. Fermentação Contínua	09
2.3. Modelos Cinéticos de Fermentação	11
2.3.1. Modelo de Limitação por Substrato	11
2.3.2. Modelo de Inibição por Produto	11
2.3.3. Modelo de Inibição por Substrato	13
2.3.4. Modelo de Inibição por Substrato e Produto	14
2.4. Estudo do Comportamento Oscilatório e Modelagem	16
2.5. Estudo da Dinâmica de Sistemas Fermentativos	19
2.5.1. Resultados Experimentais de Multiplicidade de Estados Estacionários em Biosistemas	20
2.5.2. Resultados Experimentais e teóricos de Comportamento Oscilatório em Biosistemas	20
2.6. Estudo da Dinâmica de Sistemas Não-Lineares	22
2.6.1. Estabilidade Linear e Não-Linear	23
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Microrganismo	34
3.2. Manutenção	34
3.3. Meio de Crescimento	34
3.4. Preparação do Inoculo	35
3.5. Equipamentos	36

3.6. Concentração de Células	36
3.7. Vazão Volumétrica	37
3.8. Concentração de Glicose e Etanol	38
3.9. Controle de Contaminação	38
3.10. Estudo Computacional	39
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Resultados Computacionais	42
4.2. Resultados Experimentais	59
4.2.1. Fermentação em Batelada	59
4.2.2. Fermentação Contínua	60
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES	69
5.1. Conclusões	70
5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros	71
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICES	
Apêndice 1: Curva Padrão para Determinação da Concentração do microrganismo <i>Zymomonas mobilis</i> Ag11	
Apêndice 2: Instalação do AUTO no Linux Red Hat	
Apêndice 3: AUTO97 – Subrotina Particular para Utilização do AUTO	
Apêndice 4: Dados Experimentais das Fermentações Contínuas com Diferentes Taxas de Diluição	
ANEXO: Dados experimentais de fermentações contínuas.(LI, 1995)	

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1	Estrutura dos principais hopanóides encontrados na membrana celular da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> .	7
FIGURA 2.2	Via de Entner-Duodoroff.	8
FIGURA 2.3	Comportamento dinâmico de um sistema bidimensional em diferentes combinações de valores característicos.	25
FIGURA 2.4	Diagrama de bifurcação tipo sela-nó ou dobra (fold).	27
FIGURA 2.5	Diagrama de bifurcação transcritical.	28
FIGURA 2.6	Diagrama de bifurcação supercrítico de forquilha.	29
FIGURA 2.7	Diagrama de bifurcação subcrítico de forquilha.	30
FIGURA 2.8	Diagrama de bifurcação de Hopf.	31
FIGURA 3.1	Esquema adotado no preparo do inóculo	34
FIGURA 3.2	Fermentador B. Braun Biotech International, modelo BIOSTAT®B	35
FIGURA 3.3	Fermentador New Brunswick modelo BIOFLO III	36
FIGURA 3.4	Sistema de controle da vazão volumétrica	37
FIGURA 4.1	Diagrama de bifurcação da concentração de biomassa (X) – Condição 1.	45
FIGURA 4.2	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 1.	45
FIGURA 4.3	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 1.	46
FIGURA 4.4	Diagrama de bifurcação da concentração de células (X) proposto por Monod (1949)	47
FIGURA 4.5	Diagrama de bifurcação da concentração de biomassa (X)– Condição 2.	48
FIGURA 4.6	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S)– Condição 2.	48
FIGURA 4.7	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P)– Condição 2	49

FIGURA 4.8	Diagrama de bifurcação da concentração de células (X) – Condição 01 com $S_F = 187$ .	50
FIGURA 4.9	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 01 com $S_F = 187$ .	50
FIGURA 4.10	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 01 com $S_F = 187$ .	51
FIGURA 4.11	Diagrama de bifurcação com diferentes valores para concentração de alimentação	52
FIGURA 4.12	Diagrama de bifurcação da concentração de célula (X) – Condição 3	53
FIGURA 4.13	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 3.	53
FIGURA 4.14	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 3.	54
FIGURA 4.15	Diagrama de bifurcação da concentração de células (X) – Condição 4.	54
FIGURA 4.16	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 4.	55
FIGURA 4.17	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 4	55
FIGURA 4.18	(a) Simulação dinâmica da condição 3 com diferente taxas de diluição: (•) $D = 0,02$ , (– –) $D = 0,07$ e (—) $D = 0,14$ . (b) Diagrama de bifurcação da condição 3.	56
FIGURA 4.19	Simulação Dinâmica da condição 04 em estudo.	57
FIGURA 4.20	Determinação da velocidade específica de crescimento.	58
FIGURA 4.21	Fermentação 1 – Biomassa – Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,06h^{-1}$ ).	59
FIGURA 4.22	Fermentação 1 – Substrato – Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,06h^{-1}$ ).	60
FIGURA 4.23	Fermentação 1 – Etanol - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,06h^{-1}$ ).	60
FIGURA 4.24	Fermentação 2 – Biomassa - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,0675h^{-1}$ ).	61

FIGURA 4.25	Fermentação 2 – Substrato - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,0675h^{-1}$ ).	61
FIGURA 4.26	Fermentação 2 – Etanol - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,0675h^{-1}$ ).	62
FIGURA 4.27	FIGURA 4.27: Fermentação 3 – Biomassa - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,07h^{-1}$ ).	63
FIGURA 4.28	Fermentação 3 – Substrato – Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,07h^{-1}$ ).	63
FIGURA 4.29	Fermentação 3 – Etanol - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,07h^{-1}$ ).	64
FIGURA 4.30	Diagrama de bifurcação da concentração de célula (X) – Condição 3	64
FIGURA 4.31	Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 3	65
FIGURA 4.32	Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 3	6
FIGURA AI-1	Curva de calibração para a <i>Zymomonas mobilis</i> Ag11	

## LISTA DE SÍMBOLOS

X	–	concentração de células (g/L);
S	–	concentração de glicose (g/L);
S <sub>F</sub>	–	concentração de glicose na alimentação (g/L);
S <sub>i</sub>	–	concentração de glicose abaixo da qual não ocorre inibição
P	–	concentração de etanol (g/L);
P <sub>ma</sub>		Parâmetro da equação 3.8 relacionado à inibição do crescimento por etanol (g/L);
P <sub>mb</sub>		Parâmetro da equação 3.8 relacionado com a concentração acima da qual não há crescimento de células (g/L);
P <sub>me</sub>		Parâmetro da equação 3.9 relacionado com a concentração acima da qual não há crescimento de células nem de etanol (g/L);
P <sub>ob</sub>		Parâmetro da equação 3.8 relacionado com a concentração mínima para inibição do crescimento por etanol (g/L);
Z	–	Média ponderada de 2 <sup>a</sup> ordem da velocidade de variação da concentração de etanol (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> );
W	–	média ponderada de 1 <sup>a</sup> ordem da velocidade de variação da concentração de etanol (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> );
t	–	tempo (h);
D	–	taxa de diluição (h <sup>-1</sup> );
Y <sub>P/S</sub>	–	Coefficiente de rendimento de glicose em etanol (g/g);
Q <sub>P</sub>	–	Velocidade específica de produção de etanol (g/g-h);
Q <sub>Pmax</sub>	–	Velocidade específica de produção de etanol máxima (g/g-h)
K <sub>i</sub>	–	Parâmetro relacionado à inibição por substrato (g/L).
K <sub>s</sub>	–	Parâmetro relacionado a saturação por substrato (g/L).
K <sub>mp</sub>	–	parâmetro de saturação de substrato para taxa de produção de etanol (g/L)
μ <sub>max</sub>	–	Velocidade específica de crescimento máxima (h <sup>-1</sup> );
μ(S, P, Z)	–	Velocidade específica de crescimento dinâmico (h <sup>-1</sup> );
μ(S, P)	–	Velocidade específica de crescimento instantâneo (h <sup>-1</sup> );
β	–	parâmetro da equação que pondera o peso da história da velocidade (h <sup>-1</sup> );
α		parâmetro da equação que pondera o peso da história da velocidade (h <sup>-1</sup> );
a e b		Parâmetros relacionados com a inibição de etanol no crescimento.

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 3.1	Composição do meio de crescimento	33
TABELA 3.2	Concentração utilizada do meio de crescimento	34
TABELA 4.1	Parâmetros utilizados no Modelo Dinâmico em fermentações com <i>Z. mobilis</i>	44
TABELA 4.2	Condições de operação da Fermentação 1	59
TABELA 4.3	Condições de operação da Fermentação 2	61
TABELA 4.4	Condições de Operação de Fermentação 3	63
TABELA A1.1	Modificação do arquivo “.bash_profile”	

## RESUMO

Diversos relatos de comportamento oscilatório em fermentações contínuas em CSTBR's já foram feitos e os microorganismos que têm apresentado esse comportamento dinâmico mais frequentemente são *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*. A ocorrência de oscilações pode favorecer ou prejudicar os processos bioquímicos. Desta forma, é fácil perceber a importância de estudar, através de modelagem e simulação, fermentações contínuas que apresentam tais comportamentos. Os objetivos deste trabalho foram estudar o modelo proposto por LI (1995), para representar o comportamento dinâmico da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29129 em fermentações contínuas utilizando o software computacional AUTO97, e realizar experimentos em fermentadores com *Zymomonas mobilis* Ag11 para confirmação dos comportamentos dinâmicos previstos. Os resultados computacionais mostram que os diagramas de bifurcação apresentam boa concordância com os resultados experimentais obtidos da literatura. Os comportamentos dinâmicos estudados incluem estado estacionário, oscilação amortecida e oscilação sustentada. Foram realizadas fermentações contínuas usando glicose como substrato limitante. Oscilações das concentrações de biomassa, substrato e etanol foram observadas, apresentando coerência com os diagramas de bifurcação.

**Palavras chaves:** Fermentação, Oscilação, Diagrama de Bifurcação, Modelagem, *Zymomonas mobilis*

## ABSTRACT

Many reports of oscillatory behavior in continuous fermentation in CSTBR'S were found in the pertinent literature and the microorganisms which frequently present this dynamical behavior are *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. The oscillation may favor or harm the biochemical processes. So, it is easy to perceive the importance of studying continuous fermentation that presents this behavior by modeling and simulation. The aims of this work were to study the model proposed by LI (1995) to express the dynamical behavior of *Zymomonas mobilis* ATCC 29129 in continuous fermentation using the AUTO97 software, and perform experiments using *Zymomonas mobilis* Ag11 to confirm the predicted behavior. The computation results show that the bifurcation diagrams conform very well to the experimental results obtained from literature. The studied dynamic behavior includes steady state, dumped oscillations and sustained oscillations. Continuous fermentations using glucose as limiting substrate were performed. Biomass, substrate and ethanol concentrations were observed to be coherent with the obtained bifurcations diagrams.

**Keywords:** Fermentation, Oscillation, Bifurcation diagram, Modeling, *Zymomonas mobilis*

# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

Vários estudos foram realizados para se obter uma melhor forma de produção de etanol. Diversas tecnologias foram estudadas, porém a que se mostrou mais efetiva foi à fermentação de mostos por *Saccharomyces cerevisiae* (MAGALHÃES, 1989). No entanto, outros microorganismos alternativos despertaram interesse, dentre os quais a bactéria *Zymomonas mobilis*. Elas são bactérias anaeróbias facultativas que toleram baixas concentrações de oxigênio. Nelas não se observa o “efeito Pasteur”, o desvio metabólico causado pelo oxigênio que inibe a fermentação e favorece o crescimento celular (FALCÃO DE MORAIS, 1982). Elas apresentam um crescimento mais rápido do que as leveduras, taxas de consumo de glicose e de produção de etanol mais elevadas e formação de poucos produtos secundários (LAWFORD, 1988; NOWAK 1998; ROGERS *et al.*, 1986, GALAJ *et al.*, 1994). Além de baixo rendimento celular, têm boas tolerâncias a elevadas concentrações de glicose e etanol (BUSCH *et al.*, 1992, RIOS *et al.*, 1991).

Nas últimas décadas, a teoria da bifurcação tem sido progressivamente incorporada à engenharia química na caracterização de fenômenos de multiplicidade e análise de estabilidade. O comportamento dinâmico de reatores tipo tanque contínuo de mistura perfeita (CSTRs) é um dos mais investigados (VAN HEERDEN, 1953; UPPAL *et al.*, 1974, 1976; BALAKOTAIAH & LUSS, 1983; FARR & ARIS, 1986; FREITAS FILHO *et al.*, 1994).

Esta dissertação trata o estudo computacional-experimental de fermentações contínuas em meios a base de glicose usando esta bactéria. O estudo foi dirigido para o comportamento dinâmico de um biorreator contínuo no qual ocorre uma fermentação sujeita à inibição pelo produto. A dinâmica de fermentações contínua foi estudada

teoricamente por vários pesquisadores para tipos diferentes de funções de taxa de crescimento específicas, sendo utilizado diferentes microorganismos (LENBURY *et al.*, 1994). É visto que em algumas fermentações foram identificados com comportamentos oscilatórios que provocam mudanças significativas das concentrações de biomassa, substrato e produto ao longo do tempo (LENBURY *et al.*, 1987).

Este trabalho está organizado da seguinte maneira: no capítulo 2 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a bactéria *Zymomonas mobilis* e modelagens dinâmicas de fermentações contínuas. No capítulo 3 é apresentado o material e os métodos utilizados na realização das fermentações contínuas. No capítulo 4 é apresentado o estudo computacional do modelo usado, os resultados experimentais das fermentações e discussões destes e no capítulo 5 são apresentadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

# Capítulo 2

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Zymomonas mobilis*

Conforme a proposta de SWINGS & DELEY de 1984, a bactéria *Zymomonas mobilis* engloba só uma espécie, com duas subespécies, sendo esta classificação a mais moderna:

1. *Zymomonas mobilis* subespécie *mobilis*;
2. *Zymomonas mobilis* subespécie *pomaceae*.

O gênero *Zymomonas* é formado por células em forma de bastonetes Gram-negativos com terminações arredondas, ocasionalmente elipsoidais, formando pares ou não, com comprimento de 2 a 6 µm e diâmetro de 1 a 1,4 µm. As bactérias *Zymomonas mobilis* são quimioorganotróficas, crescem em glicose ou frutose, podendo fermentar 1 mol de glicose a quase 1,6 moles de etanol, 1,8 moles de CO<sub>2</sub> e pequena quantidade de outros subprodutos como lactato, acetaldeído, ácido acético e outros (FALCÃO DE MORAIS, 1982). *Zymomonas*, como grande parte dos organismos quimioorganotróficos, necessita de fontes de nitrogênio, fósforo, enxofre e micronutrientes para o funcionamento do metabolismo.

O nitrogênio, componente de grande importância para o “pool ” enzimático e protéico das células, pode ser adicionado na forma de aminoácidos, peptona, sais de amônia, peptídeos. Segundo FRANÇA & RODRIGUES (1985), os sais de amônio e aminoácidos conduzem a um melhor crescimento, uma vez que não causam acúmulo de nitritos e nitratos. É visto conforme GALANI *et al.* (1985) que os sais NH<sub>4</sub>Cl e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> são as melhores fontes de nitrogênio.

O fósforo tem papel importante nas vias metabólicas que são iniciadas com uma fosforilação do substrato sendo elemento constituinte das moléculas de ATP que estão presentes no mecanismo energético das células. O fósforo é absorvido pelas *Zymomonas* na forma de sais como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ou  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

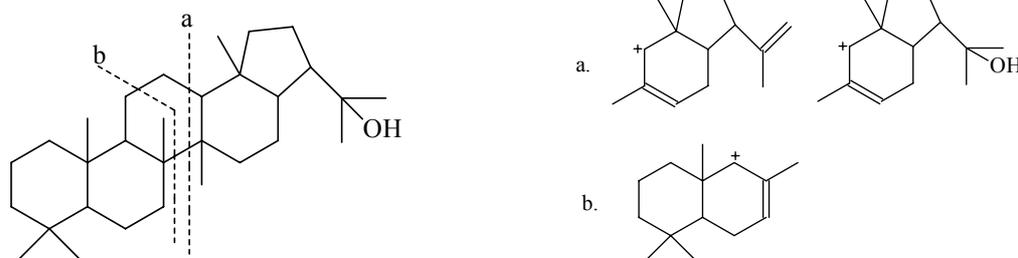
O enxofre, constituinte estrutural da célula e de grande importância para a formação de proteínas, pode ser suprido por metionina, cisteína e sulfatos (FRANÇA & RODRIGUES 1985), para a bactéria em estudo. O  $\text{MgSO}_4$  é a melhor fonte de enxofre, por servir também, como de fonte de magnésio.

O magnésio é responsável pela estabilidade estrutural de diversas enzimas, como também por prevenir a formação de vesículas na membrana externa da célula (GALANI *et al.*, 1985).

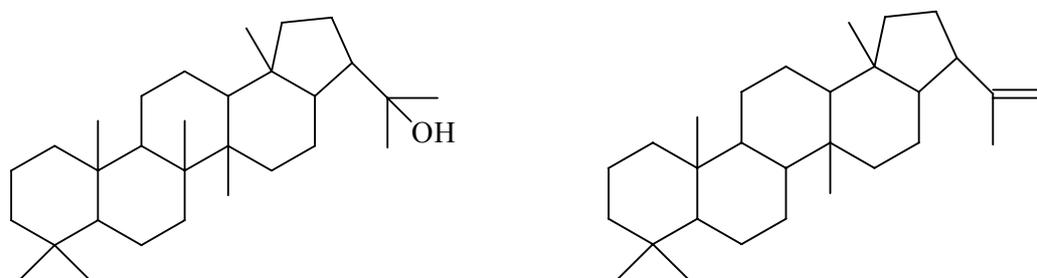
É visto na literatura classicamente, que uma característica das *Zymomonas mobilis*, apontada como uma desvantagem desta bactéria, é a quantidade limitada de substratos fermentáveis. Todas as espécies reportadas na literatura até hoje, utilizam apenas glicose, frutose, ou sacarose como fonte de energia (EVELEIGH *et al.*, 1983, in PALHA 1987).

BARROW *et al.* (1983), ao estudarem a composição lipídica da membrana celular da *Zymomonas mobilis* usando carbono e fósforo marcados, concluíram que a maior quantidade de lipídeos neutros presentes na membrana celular da linhagem CP4, consiste de hopanóides (Fig. 2.1). Os hopanóides são responsáveis por moldarem a membrana através das forças de Van der Waals entre as moléculas lipídicas. Isto aumenta a estabilidade e a permeabilidade da membrana citoplasmática, com relação ao etanol através

da regulação da distribuição de hopanóides e ácidos graxos (BRINGER *et al.*, 1985, in PALHA, 1987).



a. Modelo de fragmentos do esqueleto de hopanóides



b. Estrutura dos principais lipídeos neutros isolados de *Zymomonas mobilis*

FIGURA 2.1 – Estrutura dos principais hopanóides encontrados na membrana celular da bactéria *Zymomonas mobilis*. (BARROW *et al.*, 1983, *apud* PALHA, 1987).

SWINGS & DELEY (1977) descrevem que *Zymomonas* toleram altas concentrações de substrato chegando a crescer em meio com 20% de glicose após 34 horas de incubação. A bactéria também apresenta tolerância a altos teores de etanol, uma vez que esta bactéria é isolada de nichos naturais que contêm altos teores de etanol, as bebidas alcoólicas (MORAIS, 1982, ROGERS *et al.*, 1980)

É visto na literatura que o principal aspecto bioquímico das bactérias *Zymomonas* é a sua capacidade de produzir etanol, a partir de glicose, frutose e sacarose seguindo a via bioquímica de Entner-Doudoroff (Fig. 2.2) (ARAUD *et al.*, 1985, MCGILL *et al.*, 1971, MORAIS *et al.*, 1983, ROGERS *et al.*, 1982). Esta via, porém, apresenta

reações em comum com a via glicolítica, utilizada pelas leveduras. O rendimento energético é a metade do obtido pelas leveduras, causando assim um menor rendimento celular em massa (DAWES *et al.*, 1966).

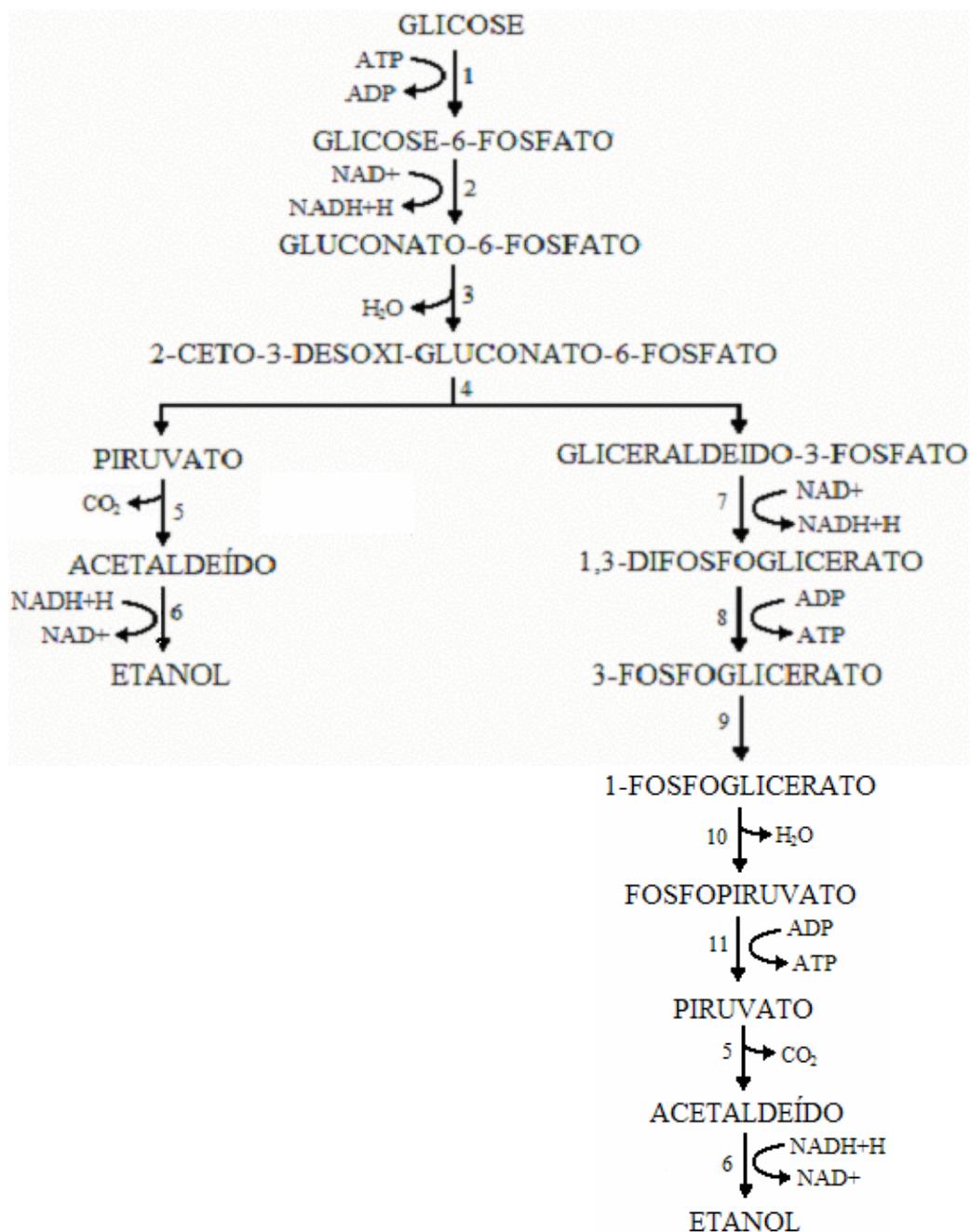


FIGURA 2.2. – Via de Entner-Duodoroff

Onde :

- 1 – Hexoquinase;
- 2 – 6-Fosfo glicose desidrogenase;
- 3 – 6-Fosfo gluconato desidratase;
- 4 – 2-Ceto-3-desoxigluconato-6-fosfo aldolase;
- 5 – Piruvato descarboxilase
- 6 – Álcool desidrogenase;
- 7 – Gliceraldeído 3-fosfo desidrogenase;
- 8 – Fosfoglicerato quinase;
- 9 – Fosfoglicerato mutase;
- 10 – Enolase
- 11 – Piruvato quinase.

O modo como a bactéria *Zymomonas* fermenta glicose a etanol, levou STOKES *et al.* (1981) a sugerirem que essa bactéria seja descendente recente de microorganismos aeróbicos através da perda de algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico.

## 2.2. Fermentação Contínua

Fermentação é a denominação dada a processos onde microorganismos metabolizam substâncias em vários produtos. É possível observar que essas conversões podem ou não necessitar de oxigênio e ainda que os próprios microorganismos podem estar incluídos entre os produtos obtidos.

Dependendo de como o substrato é adicionado e o produto é retirado, as fermentações podem ser classificadas como contínuas, semi-contínuas e descontínuas. Nas

fermentações contínuas a matéria-prima é adicionada continuamente e o meio fermentado é retirado com a mesma vazão de alimentação. Nas fermentações semi-contínuas só há entrada de material e nas descontínuas não há entrada nem saída de material.

Embora o processo contínuo pareça novo, há registro, de que ele já era usado em 1670 na fabricação de vinagre, em 1879 na produção de leveduras e em 1890 no tratamento de resíduos (DOELLE *et al.*, 1985, *apud* PALHA, 1987).

A fermentação contínua quando comparada com o processo em batelada tem a vantagem do aumento da produtividade, pelo fato de serem eliminados os tempos improdutivos do fermentador descontínuo. Os processos fermentativos podem ser conduzidos em fermentadores convencionais agitados tipo “mistura completa” ou em fermentadores tipo “tubular”.

Um estudo sobre o efeito de inibição por etanol na produção por *Zymomonas mobilis* foi realizado por BURRILL *et al.* (1983) através do qual se observa que a inibição é responsável pela concentração final do etanol.

Conforme CAREY & INGRAM (1983), o etanol induz a uma mudança na composição da membrana da bactéria *Zymomonas mobilis*, sendo esse efeito responsável pela redução da integridade da parede celular.

OSMAN & INGRAM (1985) estudaram o efeito de etanol na fermentação de *Z. mobilis* e concluíram que o etanol induz a perda de magnésio e coenzimas. Desta forma o efeito do etanol não pode ser completamente revertido. É mais fácil ocorrer perda de magnésio do que de coenzimas que são moléculas maiores.

## 2.3. Modelos Cinéticos de Fermentação

### 2.3.1. Modelo de Limitação por Substrato

MONOD (1949) realizou um trabalho pioneiro sobre a teoria da fermentação contínua, propondo um modelo para representar a velocidade de crescimento que leva em conta a concentração do substrato limitante e a velocidade específica de crescimento. Este modelo adapta-se bem a culturas contínuas que operam em regime permanente, onde o efeito inibitório do substrato é raro.

O modelo de Monod é dado pela equação:

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{(k_s + S)} \quad 2.1$$

onde  $\mu_{\text{máx}}$  é a velocidade máxima específica de crescimento,  $k_s$  é a constante de saturação pelo substrato e  $S$  é a concentração do substrato limitante do crescimento. Porém, a equação 2.1 não permite uma boa representação do comportamento dinâmico quando os substratos são limitantes do crescimento em baixas concentrações e inibitórios em concentrações mais elevadas.

### 2.3.2. Modelo de inibição por Produto

AIBA *et al.* (1969) analisaram o efeito do etanol adicionado a uma cultura em crescimento, assim uma formulação de equações matemáticas foi criada relacionando o efeito do produto e do substrato com as velocidades específicas de crescimento e de formação do produto. No modelo de Aiba, tem-se que:

$$\mu = \left( \frac{\mu_0}{(1 + (S/k_p))} \right) \left( \frac{S}{(k_s + S)} \right) \quad 2.2$$

$$\gamma = \left( \frac{\gamma_0}{(1 + S/k_p')} \right) \left( \frac{S}{(k_s' + S)} \right) \quad 2.3$$

$$\mu = \left( \frac{\mu_p}{(Y_{p/S})} \right) \quad 2.4$$

ou ainda:

$$\mu = \left( \frac{\mu_x}{(Y_{x/S})} \right) \quad 2.5$$

onde  $\mu_0$  é a velocidade máxima específica de crescimento celular,  $\gamma_0$  é a velocidade máxima específica de produção de etanol,  $k_p$ ,  $k_p'$  são as constantes de saturação pelo produto,  $k_s$ ,  $k_s'$  são as constantes de saturação pelo substrato,  $Y_{x/S}$  é o fator de conversão do substrato em células e  $Y_{p/S}$  é o fator de conversão do substrato em produto.

Segundo GHOSE & TYAGI (1979) e LOUNG (1985), algumas correlações entre  $\mu_{\max}$  e a concentração de etanol produzido foram determinadas, uma vez que o efeito de inibição por etanol afeta  $\mu_{\max}$  mas não afeta  $K_s$ . Algumas relações podem ser destacadas:

Relação Linear  $\mu(S) = \mu_{\max} \left( 1 - \frac{P}{P_m} \right) \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \quad 2.6$

Relação Exponencial  $\mu(S) = \mu_{\max} \cdot e^{-K_i P} \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \quad 2.7$

Relação Hiperbólica  $\mu(S) = \mu_{\max} \left( \frac{1}{1 + P/K_2} \right) \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \quad 2.8$

Relação Parabólica  $\mu(S) = \mu_{\max} \left( 1 - \left( \frac{P}{P_m} \right)^\alpha \right) \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \quad 2.9$

onde  $P_m$ ,  $K_1$ ,  $K_2$  e  $\alpha$  são constantes empíricas.  $P_m$  é o valor de concentração de etanol acima da qual não há crescimento. Todas as relações apresentadas acima conseguem representar uma redução da velocidade de crescimento com o aumento da concentração de etanol. As relações exponencial e hiperbólica exibem a capacidade de crescer e produzir etanol indefinitivamente. Isto não se observa na prática. Existe uma concentração acima da qual o crescimento e a fermentação cessam. ROGERS *et al.* (1988) observaram que existe uma concentração abaixo da qual o efeito de inibição pode ser desprezado. Para levar em conta este fenômeno, costuma-se modificar a relação linear introduzindo o parâmetro  $P_i$  que indica o valor abaixo do qual pode-se desprezar a inibição.

$$\mu(S) = \mu_{\max} \left( \frac{S}{K_S + S} \right) \cdot f(P) \quad 2.10$$

onde

$$\begin{aligned} f(P) &= 1 - \frac{P - P_i}{P_m - P_i} && \text{se } P_i \leq P < P_m \\ f(P) &= 1 && \text{se } P \leq P_i \\ f(P) &= 0 && \text{se } P > P_m \end{aligned} \quad 2.11$$

A correlação não linear obtida é contínua, mas não continuamente diferenciável.

### 2.3.3. Modelo de Inibição por Substrato

ANDREWS (1968) propôs uma modelagem matemática, tanto para culturas contínuas como para descontínuas, levando em conta a inibição por substrato. Com esta modelagem foi possível observar que tal inibição em culturas descontínuas faz com que haja um aumento de tempo na fase de latência. Assim, temos que:

$$\mu = \mu_{max} \left( \frac{S}{k_s + S + \frac{S^2}{k_i}} \right) \quad 2.12$$

onde,  $k_i$  consiste na constante de inibição pelo substrato.

EDWARDS (1970) realizou um estudo detalhado da influência de altas concentrações de substrato. Várias relações foram propostas:

$$\mu(S) = \frac{\mu_{max} S}{(K_s + S)(1 + S/K_i)} \quad 2.13$$

$$\mu(S) = \frac{\mu_{max} S(1 + S/K)}{K_s + S + S^2/K_i} \quad 2.14$$

$$\mu(S) = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S + (S^2/K_i)(1 + S/K)} \quad 2.15$$

$$\mu(S) = \frac{\mu_{max} S \exp(-S/K_i)}{(K_s + S)} \quad 2.16$$

$$\mu(S) = \mu_{max} (\exp(-S/K_i) - \exp(-S/K_s)) \quad 2.17$$

onde  $S$  é a concentração de substrato e  $\mu_{max}$ ,  $K$ ,  $K_i$  e  $K_s$  são constantes. Tanto para inibição por produto (etanol) quanto para inibição por substrato, existe um valor de concentração abaixo do qual o efeito de inibição pode ser desprezado (ROGERS *et al.*, 1988, LEE e ROGERS, 1983, VEERAMALLU e AGRAWAL, 1990).

#### 2.3.4. Modelo de Inibição por Substrato e Produto

Durante as fermentações de etanol ocorre um efeito combinado dos dois tipos de inibição (BRUCE *et al.*, 1991, JARZEBSKI, 1992), sendo necessário uma modelagem realista que deve considerar ambos os processos de inibição. LEE & ROGERS (1983)

propuseram a seguinte equação para representar a inibição por substrato e por produto em fermentações com a bactéria *Z. mobilis*.

$$\mu(S) = \mu_{\max} \left( \frac{S}{K_S + S} \right) \cdot f(P) \cdot g(S) \quad 2.18$$

onde  $f(P)$  é dado pela equação 2.11 e  $g(S)$  é dado por:

$$g(S) = \begin{cases} \left( \frac{K_i - S_i}{(K_i - S_i) + (S - S_i)} \right) & \text{se } S \geq S_i \\ 1 & \text{se } S \leq S_i, \end{cases} \quad 2.19$$

onde  $S_i$  é a concentração de substrato abaixo da qual não ocorre inibição e  $K_i$  é um parâmetro relacionado à inibição por substrato.

ROGERS *et al.* (1982) observaram que para fermentações com a bactéria *Z. mobilis* ocorre um fenômeno conhecido como “desacoplamento da produção de etanol em relação ao crescimento celular”. Em outras palavras, o consumo de glicose e a produção de etanol permanecem temporariamente inalterados quando a velocidade de crescimento diminui.

LEE e ROGERS (1983) propuseram um modelo para a inibição da velocidade específica de produção de etanol pela ação do produto e do substrato.

$$Q_P = Q_{P\max} \left( \frac{S}{K'_S + S} \right) \cdot \left( \frac{K'_i}{K'_i + S} \right) \cdot f(P) \quad 2.20$$

onde  $f(P)$  é dado pela equação 2.11.

VEERAMALLU E AGRAWAL (1990) propuseram um modelo para combinar os efeitos de inibição por etanol e por substrato em fermentações com a bactéria *Z. mobilis* ATCC 10988.

$$\mu(S, P) = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{ma}}\right)^a\right) \cdot f(P)}{k_s + \frac{S}{g(S)}} \quad 2.21$$

onde  $g(S)$  é dada pela equação 2.19 e  $f(P)$  é dado por:

$$\begin{aligned} f(P) &= 1 && \text{se } P \leq P_{ob} \\ f(P) &= 1 - \left(\frac{P - P_{ob}}{P_{mb} - P_{ob}}\right)^b && \text{se } P_{ob} \leq P < P_{mb} \\ f(P) &= 0 && \text{se } P > P_{mb} \end{aligned} \quad 2.22$$

Onde  $P_m$  é a concentração acima da qual não há crescimento,  $P_{ob}$  é a concentração mínima para inibição do crescimento por etanol,  $P_{ma}$ ,  $a$  e  $b$  são parâmetros relacionados à inibição do crescimento por etanol.

#### 2.4. Estudo do Comportamento Oscilatório e Modelagem

Uma das grandes desvantagens associadas à fermentação contínua das bactérias *Zymomonas mobilis* é a incidência de um comportamento oscilatório da biomassa, do substrato e do produto (PINHEIRO, 2001, BRUCE *et al.*, 1991; GHOMMIDH *et al.*, 1989; LEE *et al.*, 1980). Durante estes períodos de oscilação, muito comuns em determinadas condições de fermentação, verifica-se uma redução da produção de etanol e um acúmulo de substrato, que resulta na redução do rendimento. Para caracterizar esta situação em que as células exibem uma velocidade de crescimento menor ou igual à velocidade correspondente a condições normais de cultura, foram propostos por diferentes autores os conceitos de crescimento específico dinâmico (MCLELLAN *et al.*, 1999). Com base neste conceito, vários modelos cinéticos dinâmicos estão sendo propostos para descrever a componente transiente das concentrações de biomassa, de substrato e de etanol. Estes modelos têm sido

utilizados com sucesso para descrever resultados experimentais relativos às fermentações com *Zymomonas mobilis* e também para resultados de experiências com oscilações forçadas (MCLELLAN *et al.*, 1999; XIU *et al.*, 1998; DAUGULIS *et al.*, 1997; JÖBSES *et al.*, 1986).

A tendência para comportamento oscilatório foi avaliada perturbando-se a concentração de alimentação de substrato e a taxa de diluição em uma fermentação contínua a partir de várias condições iniciais distintas.

Um dos modelos utilizados para tal fim é o modelo tri-compartimentado baseado em células viáveis, não viáveis e mortas (GOMMIDH *et al.*, 1989; JARZEBSKI 1992). Outro exemplo, é o modelo bi-compartimentado, onde a biomassa foi dividida nos compartimentos K e G. O compartimento K é formado por RNA, carboidratos e monômeros de moléculas enquanto que o compartimento G consiste em DNA, lipídios e proteínas (JÖBSES *et al.*, 1986) e o modelo metabólico (VEERAMALLU & AGRAWAL 1990, JÖBSES *et al.*, 1985) onde há representação de grupos de macromoléculas.

O modelo proposto por GOMMIDH *et al.*, (1989) baseia-se na hipótese do substrato ser convertido em energia e produto a uma velocidade constante pelas células vivas, independentemente da velocidade de crescimento e das altas concentrações de etanol, o efeito desnaturante do etanol resulta em perda de viabilidade e/ou parte da célula.

JÖBSES *et al.* (1986) sugeriram que devido às complexidades do metabolismo para o crescimento do microorganismo e sua manutenção, o enfoque do modelo desenvolvido deveria ser para uma melhor habilidade na descrição e na dedução qualitativa do comportamento, em lugar da representação detalhada de estados internos.

LI *et al.* (1997) desenvolveram um modelo onde a inibição depende da velocidade de variação de concentração de etanol. O modelo proposto consiste em cinco equações diferenciais:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu(S, P, Z) - D) \cdot X \quad 2.23$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_F - S) - \frac{Q_P(S, P) \cdot X}{Y_{P/S}} \quad 2.24$$

$$\frac{dP}{dt} = Q_P(S, P) \cdot X - D \cdot P \quad 2.25$$

$$\frac{dZ}{dt} = \beta \cdot (W - Z) \quad 2.26$$

$$\frac{dW}{dt} = \beta \cdot (Q_P(S, P) \cdot X - D \cdot P - W) \quad 2.27$$

onde a velocidade específica de crescimento dinâmica é

$$\mu(S, P, Z) = \mu(S, P) \cdot f_\mu(Z(t)) \quad 2.28$$

a velocidade específica de crescimento instantânea é dada por

$$\mu(S, P) = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{ma}}\right)^a\right) \cdot f(P)}{k_s + \frac{S}{g(S)}} \quad 2.29$$

$$f_\mu(Z(t)) = \frac{1}{2} \cdot \left(1 - \frac{e^{\lambda \cdot Z(t) - \delta} - e^{-\lambda \cdot Z(t) + \delta}}{e^{\lambda \cdot Z(t) - \delta} + e^{-\lambda \cdot Z(t) + \delta}}\right) \quad 2.30$$

onde  $g(S)$  é dado por 2.19 e  $f(P)$  é dado por 2.22. A velocidade específica de produção de etanol é dada por

$$Q_P = \frac{Q_{P\max} \cdot S}{k_{mP} + S} \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{me}}\right)^\alpha\right) \quad 2.31$$

## 2.5. Estudo da Dinâmica de Sistemas Fermentativos

Para muitos, o primeiro trabalho de engenharia que explorou a estabilidade em sistemas de reação química foi o de VAN HEERDEN (1953), no qual se investigou a dinâmica de reatores contínuos de mistura perfeita com uma reação exotérmica de primeira ordem, depois chamado de *sistema clássico*. Neste estudo foi possível observar a multiplicidade de estados estacionários para o sistema de reação. De fato, o primeiro trabalho que explorou a questão da estabilidade em sistemas de reação química foi o de LILJENROTH (1918), com o estudo da estabilidade de reações de oxidação da amônia e reações similares.

Porém, o formalismo necessário para a determinação do número de possíveis estados estacionários e a estabilidade destes só foi consolidado com os trabalhos de AMUNDSON *et al.* (1955, 1958 a,b,c). Eles desenvolveram um critério para determinação da direção da bifurcação e estudaram a estabilidade dos ciclos limites.

O primeiro método de Liapunov foi usado na investigação da estabilidade dos estados estacionários, daí surgiu a necessidade de um confronto similar com os reatores bioquímicos, uma vez que sistemas biológicos têm uma tendência natural para periodicidade (AGRAWAL *et al.*, 1982).

Na literatura são encontrados diversos resultados experimentais e teóricos de multiplicidades de estados estacionários em biosistemas, bem como também resultados experimentais e teóricos de comportamento oscilatório em biosistemas.

### 2.5.1. Resultados Experimentais de Multiplicidade de Estados Estacionários em Biosistemas

PAWLOWKY & HOWEEL (1973) e CHI *et al.* (1974, 1976) realizaram estudos do comportamento teórico e experimental de um CSTR com crescimento celular na parede e sujeito a inibição por fenol, observando multiplicidade de estados estacionários do sistema de malha aberta com um estado estacionário de baixa conversão tendo crescimento de células somente na parede do reator.

Os primeiros pesquisadores ao observarem histerese de estados estacionários em biorreatores tipo CSTR foram IMANAKA *et al.* (1972, 1973), que mostraram experimentalmente a existência de multiplicidade de estados estacionários através da adição de fenol ou de um concentrado de microorganismos.

CHEN *et al.* (1990) fizeram o estudo do comportamento dinâmico de biorreatores contínuos quando submetido a diferentes condições de operações (taxa de alimentação, concentração de glicose na alimentação) e observaram multiplicidade de soluções para o sistema, sendo uma oscilatória e a outra estacionária.

### 2.5.2. Resultados Experimentais e Teóricos de Comportamento Oscilatório em Biosistemas

Segundo REGAN *et al.* (1971), o trabalho realizado por Fuld em 1961 foi o primeiro estudo dinâmico de biorreatores contínuos. Em sistemas bioquímicos contínuos é muito comum o surgimento de comportamento oscilatório, tanto em condições fermentativas quanto oxidativas.

MAXON (1960) observou oscilações durante o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em biorreatores semelhantes às aquelas encontradas por FINN e WILSON (1954).

GILLEY & BUNGAY (1967) observaram oscilações na concentração celular de uma mistura de microorganismos, quando sujeito a variações a concentração de substrato na alimentação e na taxa de diluição.

Dez anos depois, BORZANI *et al.* (1977) observaram, em culturas aeróbias de *Saccharomyces cerevisiae*, oscilações nas velocidades de crescimento quando fontes de nitrogênio foram adicionadas a misturas de alimentação e para adição de determinada faixa de velocidade de aeração. As oscilações somente foram observadas em uma faixa de taxa de aeração. O meio de crescimento era à base de melado de cana-de açúcar. Diversos outros trabalhos foram desenvolvidos utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*, como o trabalho de PORRO *et al.* (1988). Neste, observou-se que as oscilações ocorreram em faixas bem definidas de taxas de diluição e concentrações de oxigênio e que o período das oscilações está relacionado com período de duplicação da massa CHEN *et al.* (1990 a,b). Os autores descrevem ainda que as oscilações observadas são caracterizadas por uma sincronia parcial do crescimento celular.

PINHEIRO (2001) observou oscilações em culturas de *Zymomonas mobilis* CP4. Tais oscilações puderam ser explicadas pela hipótese de que o coeficiente de rendimento de substrato em células é uma função da concentração de substrato. Já o coeficiente de rendimento de substrato em produto pode levar a oscilações se a velocidade de crescimento for somente função do substrato e do produto.

AMUNDSON *et al.* (1955, 1958 a,b,c) foram os primeiros a obterem resultados teóricos sobre o comportamento periódico em reatores químicos. O comportamento dinâmico de culturas contínuas e em batelada e os modelos: estruturado e não-estruturado foram estudados por RAMKRISHNA *et al.* (1967).

## 2.6. Estudo da Dinâmica de Sistemas Não-Lineares

A maior parte das modelagens matemáticas da engenharia química resulta em equações diferenciais que não possuem solução analítica ou as soluções são de difícil interpretação. Para investigar estes sistemas recorre-se ao estudo qualitativo das equações diferenciais que procura identificar as características importantes das soluções sem resolvê-las. Estes procedimentos servem tanto para equações lineares quanto não-lineares. Essa metodologia está fundamentada em um razoável esforço numérico computacional e em conceitos e teorias. A seguir é apresentada uma breve discussão sobre esse tema.

Considere-se uma EDO do tipo:

$$\frac{dy}{dt} = g(x, y) \quad 2.32$$

Sendo  $P = (x^*, y^*)$  uma solução estacionária,  $(x^*, y^*)$  é assintoticamente estável, se a resposta do sistema a uma pequena perturbação se aproxima de  $(x^*, y^*)$  quando  $t \rightarrow \infty$ , ou ainda  $(x(t), y(t)) \rightarrow (x^*, y^*)$ , para  $(x, y)$  próximo de  $(x^*, y^*)$ , que é chamado de atrator. Quando a resposta do sistema a uma pequena perturbação permanece pequena para  $t \rightarrow \infty$ ,  $(x^*, y^*)$  é dito estável e quando aumenta indefinidamente é dita instável. Há ainda um terceiro tipo de

estabilidade, chamada de *estabilidade estrutural*, que está relacionada com a capacidade do sistema em reter suas características dinâmicas, ou seja, quando o plano de fases varia diante da perturbação do campo vetorial completo. Quando há perda da estabilidade estrutural, ocorre a denominada *bifurcação*.

### 2.6.1. Estabilidade Linear e Não-Linear

Seja um sistema linear bidimensional do tipo:

$$\dot{x} = ax + by = f(x, y) \quad 2.33$$

$$\dot{y} = cx + dy = g(x, y)$$

onde  $\dot{x}$  e  $\dot{y}$  são, respectivamente,  $\frac{dx}{dt}$  e  $\frac{dy}{dt}$ , respectivamente. Este sistema possui um ponto de equilíbrio (solução estacionária do sistema) em  $(x^*, y^*) = (0, 0)$  e uma solução geral do tipo

$$\begin{aligned} X(t) &= x_0 e^{\lambda t} \\ Y(t) &= y_0 e^{\lambda t} \end{aligned} \quad 2.34$$

Desta forma, substituindo 2.32 em 2.31, obtém-se o sistema

$$\begin{aligned} (a - \lambda).x_0 + b.y_0 &= 0 \\ c.x_0 + (d - \lambda).y_0 &= 0 \end{aligned} \quad 2.35$$

A solução da equação 2.35 não é trivial, assim é necessário utilizar o determinante da matriz dos coeficientes e este deve ser nulo, assim:

$$\det \begin{bmatrix} (a - \lambda) & b \\ c & (d - \lambda) \end{bmatrix} = 0 \quad 2.36$$

No caso de  $n$  dimensões, basta reescrever 2.33 - 2.35 em notação vetorial. Definindo que  $\vec{x}(t) = (x(t), y(t))$  e  $\dot{\vec{x}}(t) = (\dot{x}(t), \dot{y}(t))$ , a matriz fica:

$$\begin{bmatrix} a & b \\ c & d \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \partial f / \partial x & \partial f / \partial y \\ \partial g / \partial x & \partial g / \partial y \end{bmatrix} = J \quad 2.37$$

denominada *matriz Jacobiana* do sistema. Na forma vetorial

$$\dot{\vec{x}} = J \vec{x}(t) \quad 2.38$$

cuja solução geral é:

$$\vec{x}(t) = e^{\lambda t} \vec{x}_0 \quad 2.39$$

tem-se:

$$(J - \lambda I) \vec{x}_0 = 0 \quad 2.40$$

onde  $I$  é a matriz identidade e  $\lambda$  e  $\vec{x}_0$  são, respectivamente, os autovalores e os autovetores da matriz Jacobiana. Para a determinação dos autovalores devemos resolver:

$$\det(J - \lambda I) \vec{x}_0 = 0 \quad 2.41$$

Resolvendo a equação 2.36, temos que:

$$(a - \lambda)(d - \lambda) - bc = 0 \quad 2.42$$

tendo-se assim duas raízes  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ , onde estas duas raízes determinarão a estabilidade do ponto de equilíbrio  $P^* = (0, 0)$ .

Seja  $\lambda = \text{Re}(\lambda) + i \text{Im}(\lambda)$ , onde  $\text{Re}$  e  $\text{Im}$  correspondem, respectivamente, as partes real e imaginária do autovalor. Assim, a estabilidade depende essencialmente da parte real dos valores característicos. Portanto:

$$\text{Se } \text{Re}(\lambda) > 0 \rightarrow e^{\text{Re}(\lambda)t} \text{ cresce continuamente e } x(t) \rightarrow \infty \text{ quando } t \rightarrow \infty$$

Se  $\text{Re}(\lambda) < 0 \rightarrow e^{\text{Re}(\lambda)t}$  decresce continuamente e  $x(t) \rightarrow 0$  quando  $t \rightarrow \infty$

De forma resumida, na Figura 2.3, encontra-se a classificação das soluções estacionárias de um sistema bidimensional para todas as possíveis combinações dos valores característicos (FERRARA & PRADO, 1995).

Seja o sistema de equações diferenciais não-lineares:

$$\dot{x} = f(x, y) \quad 2.43$$

$$\dot{y} = g(x, y) \quad 2.44$$

com ponto de equilíbrio em  $P^* = (x^*, y^*)$ . Escrevem-se as expansões em série de Taylor das equações diferenciais não-lineares que formam o sistema como:

$$\begin{aligned} \dot{x} = f(x, y) = & f(x^*, y^*) + \frac{\partial f}{\partial x}(x^*, y^*) \cdot (x - x^*) \\ & + \frac{\partial f}{\partial y}(x^*, y^*) \cdot (y - y^*) + \text{termos de ordem superior} \end{aligned} \quad 2.45$$

$$\begin{aligned} \dot{y} = g(x, y) = & g(x^*, y^*) + \frac{\partial g}{\partial x}(x^*, y^*) \cdot (x - x^*) \\ & + \frac{\partial g}{\partial y}(x^*, y^*) \cdot (y - y^*) + \text{termos de ordem superior} \end{aligned} \quad 2.46$$

Autovalores	Sinal da parte real	Representação no plano complexo	Ponto fixo	Exemplo	Estabilidade
$\lambda_1 \neq \lambda_2$ $\lambda_1, \lambda_2 \neq 0$ $\lambda_1, \lambda_2 \in \mathbb{R}$	$\lambda_1, \lambda_2 > 0$ $\lambda_1, \lambda_2 < 0$		nó (hiperbólico)		assintoticamente estável
	$\lambda_1, \lambda_2 > 0$ $\lambda_1, \lambda_2 > 0$		nó (hiperbólico)		instável
	$\lambda_1, \lambda_2 < 0$		sela (hiperbólica)		instável
$\lambda_1 = \lambda_2^*$ (Complexos conjugados)	positiva		foco (hiperbólico)		instável
	negativa		foco (hiperbólico)		assintoticamente estável
	nula		centro (elíptico) CASO DEGENERADO		estável (não assintoticamente)
$\lambda_1, \lambda_2 = 0$	nula	CASOS DEGENERADOS (elípticos)			
$\lambda_1 = \lambda_2 \neq 0 \in \mathbb{R}$	positiva		"Inflected node" (hiperbólico)		instável
	negativa		"Inflected node" (hiperbólico)		assintoticamente estável

Figura 2.3 – Comportamento dinâmico de um sistema bidimensional em diferentes combinações de valores característicos. (FERRARA e PRADO, 1995)

A definição das variáveis  $\tilde{x} = x - x^*$  e  $\tilde{y} = y - y^*$  e a partir da observação que  $\dot{\tilde{x}} = \tilde{x}$ ,  $\dot{\tilde{y}} = \tilde{y}$  e  $f(x^*, y^*) = g(x^*, y^*) = 0$ , leva à linearização das equações 2.41 e 2.42, quando se desprezam os termos de ordem superior:

$$\dot{\tilde{x}} = \frac{\partial f}{\partial x} \Big|_{x^*, y^*} \tilde{x} + \frac{\partial f}{\partial y} \Big|_{x^*, y^*} \tilde{y} = a\tilde{x} + b\tilde{y} \tag{2.47}$$

$$\dot{\tilde{y}} = \frac{\partial g}{\partial x} \Big|_{x^*, y^*} \tilde{x} + \frac{\partial g}{\partial y} \Big|_{x^*, y^*} \tilde{y} = c\tilde{x} + d\tilde{y} \tag{2.48}$$

onde as derivadas são calculadas no ponto fixo  $P^* = (x^*, y^*)$ . A matriz dos coeficientes é chamada de matriz jacobiana dada pela equação 2.37, calculada no ponto fixo. A resolução de 2.43 e 2.44 fornece  $\tilde{x}(t)$  e  $\tilde{y}(t)$  que são as aproximações de primeira ordem para as distâncias entre os pontos  $(x(t), y(t))$  da trajetória e o ponto fixo.

Esta aproximação mostra a evolução do sistema quando as condições iniciais são próximas do ponto de equilíbrio. GUCKENHEIMER & HOLMES (1983) demonstraram que a estabilidade de um equilíbrio hiperbólico não é afetada pela linearização, ao contrário dos casos de pontos elípticos, onde a análise linear não permite obter conclusões sobre estabilidade do ponto de equilíbrio, FERRARA (1995). A linearização faz com que as soluções sejam aproximadas e com validade para pequenas distâncias em torno do ponto de equilíbrio.

Como já foi dito, uma vez que haja uma perda de estabilidade estrutural o sistema sofre bifurcação. Existem vários tipos de bifurcações, que serão apresentadas a seguir:

- Bifurcação Sela-Nó ou de dobra (*Fold*)

Observa-se neste tipo de bifurcação que o estado estacionário é estável no ramo superior, chamado de *nó* e é instável no ramo inferior, chamado de *sela*. Para melhor demonstração têm-se como exemplo, a seguinte equação diferencial:

$$\frac{dx}{dt} = \mu - x^2 \quad 2.49$$

Neste caso, para  $\mu \geq 0$  existe solução para o sistema acima e o ponto  $(\mu, x) = (0, 0)$  é um ponto de retorno. A análise da estabilidade recai no estudo do sinal em cada um dos dois ramos de soluções estacionárias. Assim, conclui-se que o ramo superior é estável e o inferior instável. Análise da estabilidade:

$$\left. \frac{df_\mu}{dx} \right|_{x=+\sqrt{\mu}} = -2\sqrt{\mu} \qquad \left. \frac{df_\mu}{dx} \right|_{x=-\sqrt{\mu}} = +2\sqrt{\mu}$$

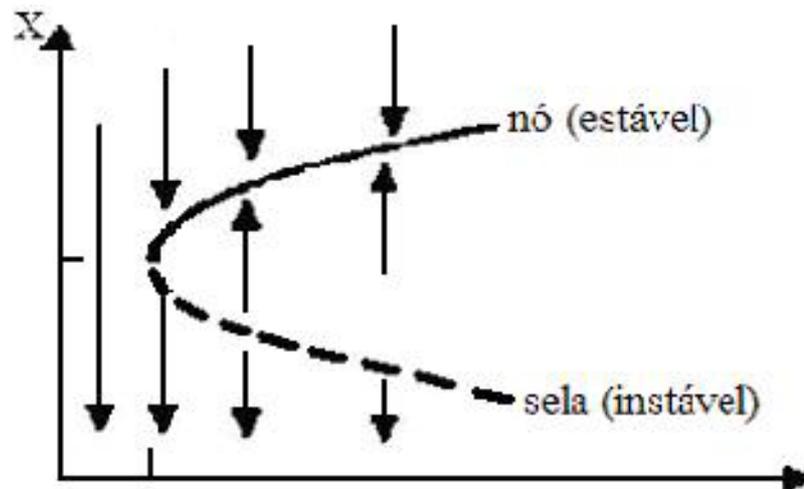


Figura 2.4 - Diagrama de bifurcação tipo sela-nó ou dobra (fold). (FERRARA e PRADO, 1995)

- Bifurcação Transcrítica (Fig. 2.5)

Considerando-se a equação abaixo:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - x^2 \qquad 2.50$$

Observa-se que para esta equação existem dois ramos de soluções, a saber:  $x = 0$  e  $x = \mu$ . A análise da estabilidade desses ramos indica que para  $\mu < 0$ , o ramo  $x = 0$  é estável e o ramo  $x = \mu$  é instável. O oposto ocorre para  $\mu > 0$ . Análise da estabilidade:

$$\left. \frac{df_\mu}{dx} \right|_{x=0} = \mu \qquad \left. \frac{df_\mu}{dx} \right|_{x=\mu} = \mu$$

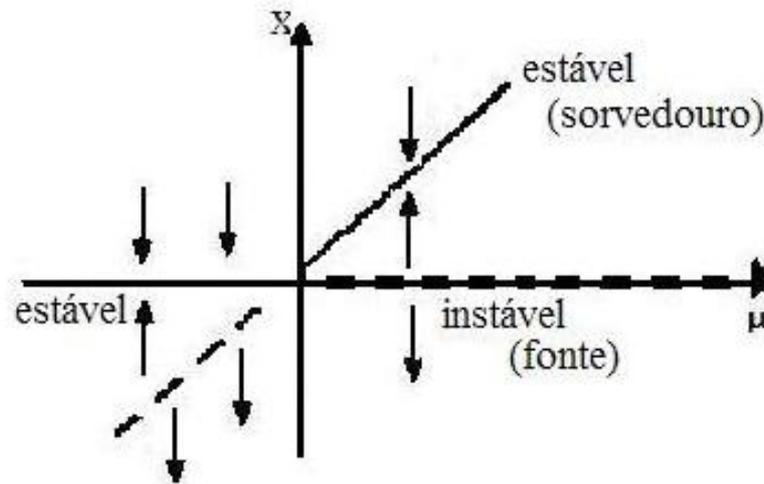


Figura 2.5 – Diagrama de bifurcação transcritical. (FERRARA e PRADO, 1995)

- Bifurcação de Forquilha (*Pitchfork ou Cusp*)

Esse tipo de bifurcação pode ser subdividido em dois tipos específicos:

- Bifurcação Supercrítica de Forquilha

Como exemplo de bifurcação supercrítica de forquilha, considera-se a equação abaixo:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - x^3 \quad 2.51$$

A partir do ponto de bifurcação  $(\mu, x) = (0, 0)$  (onde ocorre mudança da estrutura do comportamento dinâmico) passa a existir o ramo de soluções  $x = \pm\sqrt{\mu}$  que é sempre estável enquanto o outro ramo de soluções ( $x=0$ ) é estável somente para  $\mu < 0$ . Análise da estabilidade:

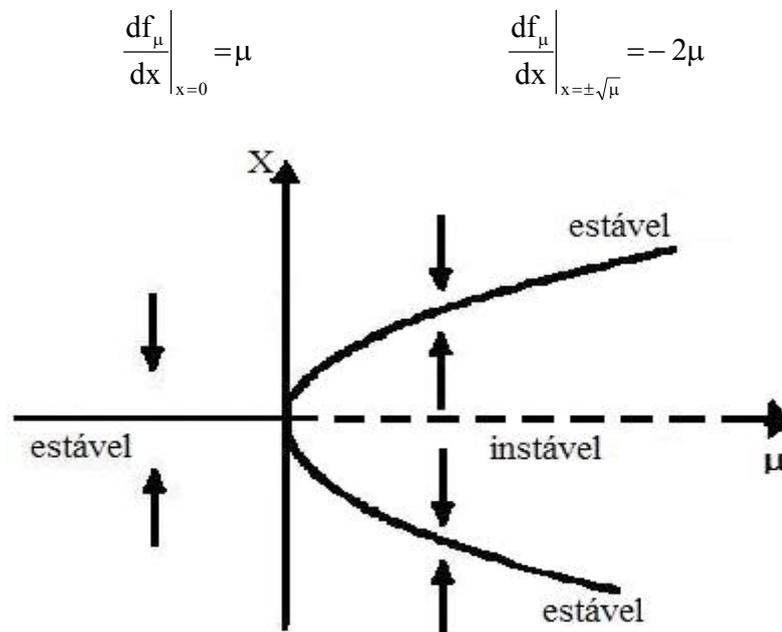


Figura 2.6 - Diagrama de Bifurcação supercrítica de forquilha. (FERRARA e PRADO, 1995)

- Bifurcação Subcrítica de Forquilha

Um exemplo de bifurcação subcrítica de forquilha é dado pela equação abaixo:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x + x^3 \qquad 2.52$$

$$\left. \frac{df_\mu}{dx} \right|_{x=0} = \mu \qquad \left. \frac{df_\mu}{dx} \right|_{x=0} = \mu$$

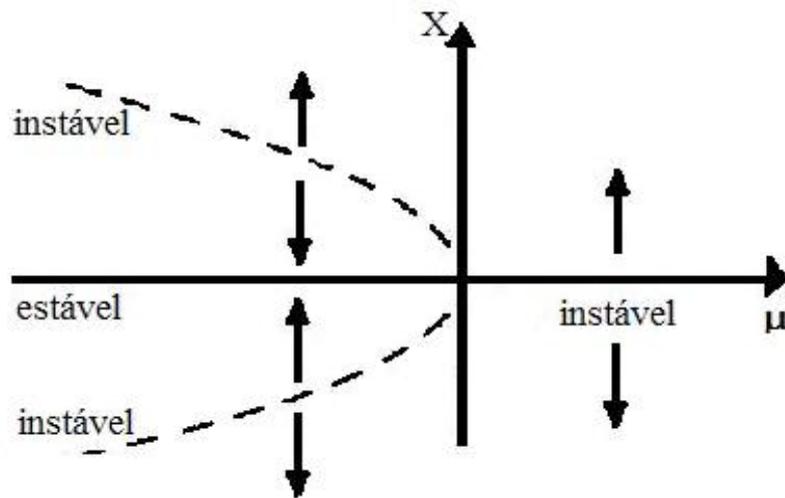


Figura 2.7 - Diagrama de Bifurcação subcrítica de forquilha. (FERRARA e PRADO, 1995)

- Bifurcações de Hopf

*Bifurcação de Hopf* é a bifurcação de um equilíbrio (solução estacionária do problema) para uma oscilação periódica. A matriz Jacobiana no ponto de bifurcação de Hopf tem um par de valores característicos puramente imaginários (característica da *bifurcação de Hopf*). A bifurcação de Hopf liga um equilíbrio a um movimento periódico.

Seja o sistema de EDO:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= -y + x(\mu - x^2 - y^2) \\ \frac{dy}{dt} &= -x + y(\mu - x^2 - y^2) \end{aligned} \quad 2.53$$

A única solução para este sistema é  $(x^*, y^*) = (0, 0)$  que, pela análise dos valores característicos  $\mu \pm i$ , é estável para  $\mu < 0$  e instável para  $\mu > 0$  com perda de

estabilidade em  $x = 0$ . Uma melhor forma de se compreender o que acontece é obtida reescrevendo as equações acima em coordenadas polares:

$$\begin{aligned} \frac{dr}{dt} \cos \theta - r \frac{d\theta}{dt} \sin \theta &= -r \sin \theta + r \cos \theta (\mu - r^2) \\ \frac{dr}{dt} \sin \theta + r \frac{d\theta}{dt} \cos \theta &= r \cos \theta + r \sin \theta (\mu - r^2) \end{aligned} \quad 2.54$$

Multiplicando a primeira equação por  $\cos \theta$  e a segunda por  $\sin \theta$ :

$$\frac{dr}{dt} = r(\mu - r^2) \quad \text{e} \quad \frac{d\theta}{dt} = 1 \quad 2.55$$

Existe, portanto, uma órbita periódica para  $\mu > 0$  que é estável. Como se pode observar na Figura 2.8, o ponto de bifurcação liga um equilíbrio a um movimento periódico. A análise da estabilidade mostra que se tem foco estável para  $\mu < 0$  e ciclo limite para  $\mu > 0$ .

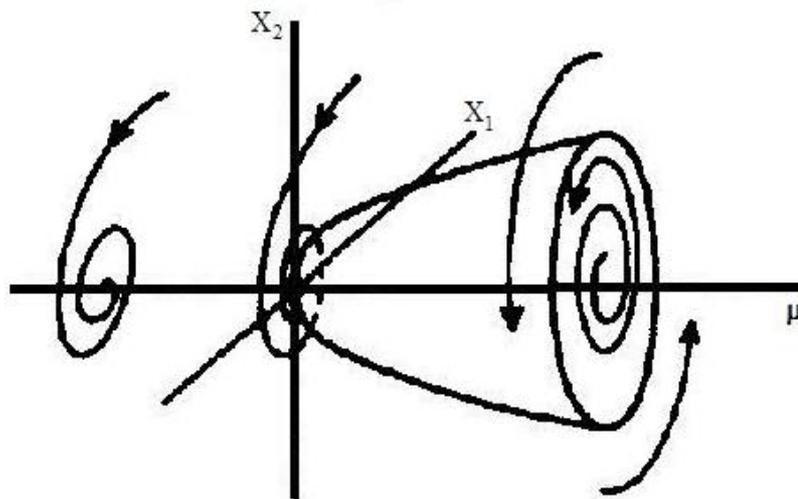


Figura 2.8 - Diagrama de Bifurcação Hopf. (FERRARA e PRADO, 1995)

# Capítulo 3

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismo

O microrganismo usado foi a bactéria *Zymomonas mobilis* linhagem Ag11 DAUFPE 198, fornecida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Esta linhagem foi escolhida por não flocular (PALHA, 1987).

#### 3.2. Manutenção

O microrganismo foi mantido em geladeira a 4°C, após crescimento em estufa a 30°C por 24 horas em meio SDL (20g/L de glicose e 5g de extrato de levedura) sendo repicado mensalmente.

#### 3.3. Meio de Crescimento

O meio de crescimento usado nas fermentações em estudo foi o mesmo usado por LI (1995), cuja composição é apresentada na Tabela 3.1.

TABELA 3.1: Composição do meio de crescimento de LI (1995)

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)
GLICOSE	165
EXTRATO DE LEVEDURA	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,75

A glicose, o extrato de levedura e os sais foram dissolvidos separadamente em água destilada e esterilizados a 121°C por 15 minutos. Após atingir a temperatura ambiente as soluções foram misturadas.

A concentração do meio utilizada nos experimentos foi (Tabela 3.2):

TABELA 3.2: Concentração utilizada do meio de crescimento

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)	MARCA
GLICOSE	200	Vetec
EXTRATO DE LEVEDURA	18,18	Vetec
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,81	Cinética
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,81	Biolife Italiana S.r.l.
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,91	Vetec

### 3.4. Preparação do Inóculo

A linhagem Ag11 foi inoculada em 10 mL de meio de crescimento e incubada por 24 horas a 30°C. Após esse tempo, transferiu-se para um frasco contendo 70 mL do meio nas mesmas condições descritas anteriormente e, depois de 24 horas, transferiu-se para o fermentador contendo 720 mL de meio fermentado. O esquema adotado encontra-se na Figura 3.1, a seguir.

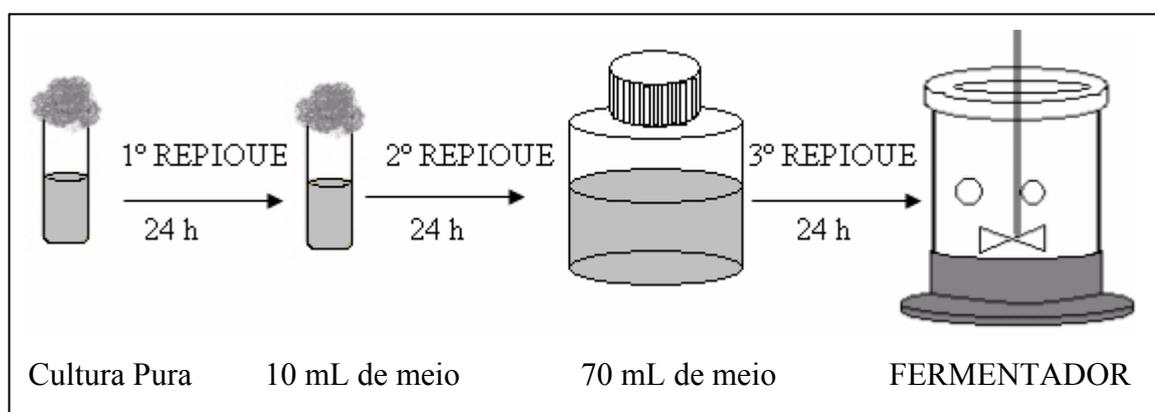


FIGURA 3.1 – Esquema adotado no preparo do inóculo.

### 3.5. Equipamentos

As fermentações foram realizadas em dois equipamentos: New Brunswick, modelo BIOFLO III, com 1L de volume útil e o B. Braun Biotech International, modelo BIOSTAT® B com 2L de volume útil (Fig. 3.2 e Fig. 3.3). Ambos os fermentadores possuem controle de agitação, de temperatura e de pH. Estes parâmetros foram mantidos em 150rpm, 30°C e 5,0 respectivamente. O pH foi controlado com adição de KOH (1M), uma vez que durante o crescimento da bactéria *Z. mobilis* ele tende a diminuir.

### 3.6. Concentração de células

A concentração de células foi monitorada descontinuamente através de um espectrofotômetro (Hewlett Packard 8453) ajustado para  $\lambda=660\text{nm}$ . Uma curva de calibração foi construída para correlacionar biomassa e absorbância (ver Apêndice I).

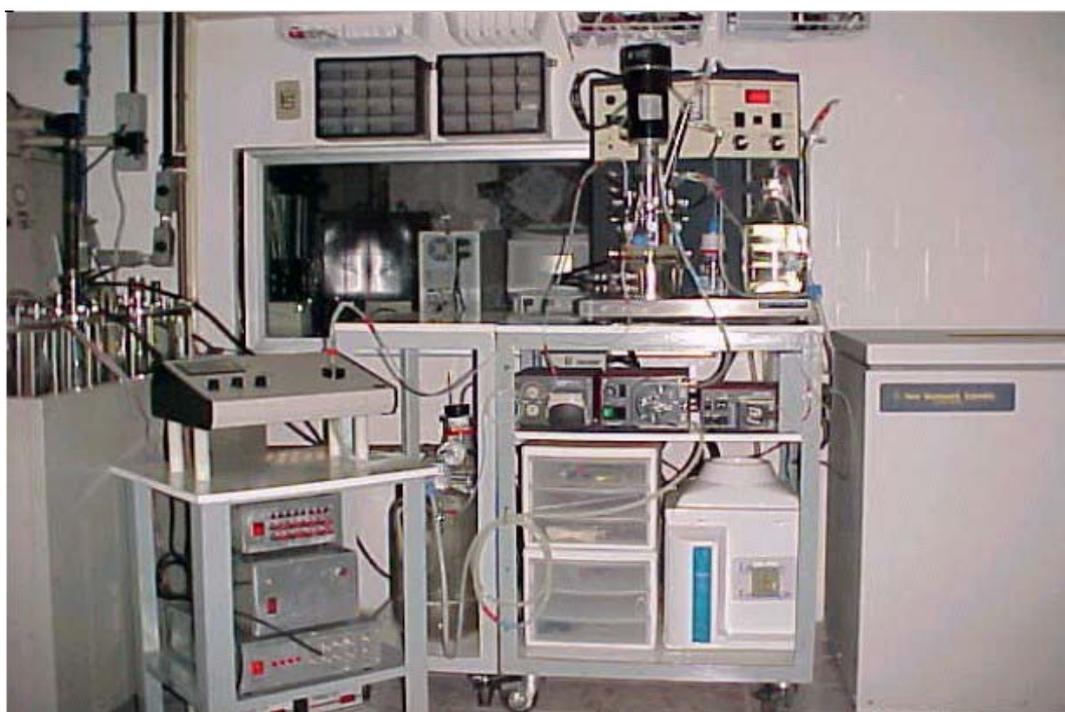


FIGURA 3.3: Fermentador New Brunswick modelo BIOFLO III

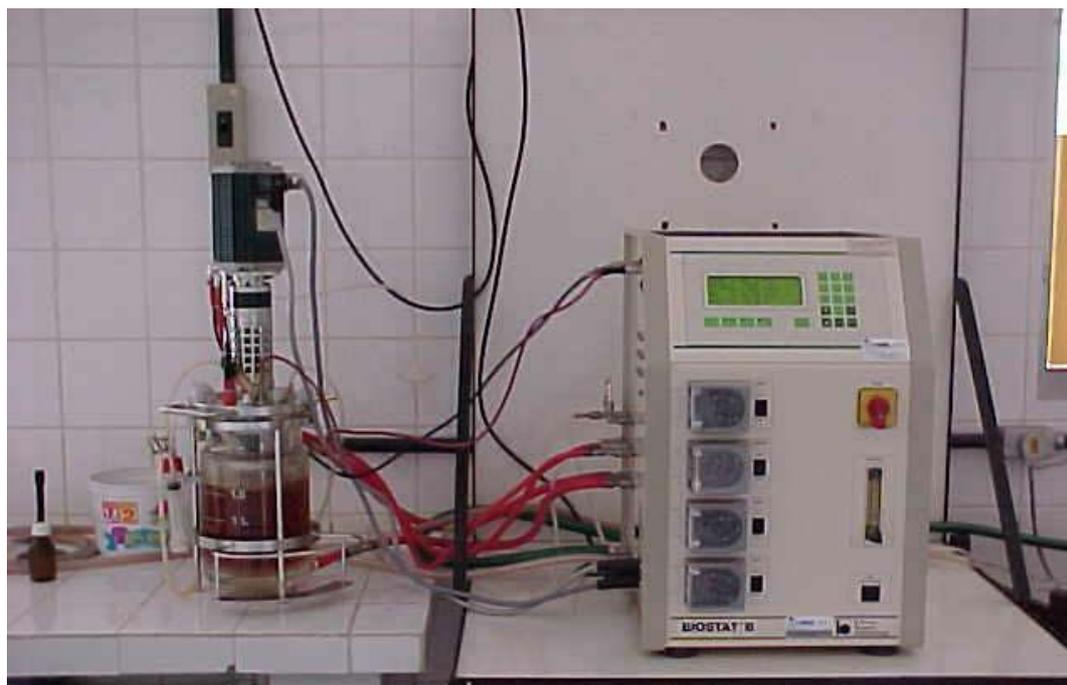


FIGURA 3.2: Fermentador B. Braun Biotech International, modelo BIostat<sup>®</sup>B

### 3.7. Vazão volumétrica

O biorreator foi alimentado através de uma bomba peristáltica. A vazão foi conferida através de um sistema que contou com uma pipeta, um filtro de ar, mangueiras de silicone e conexões. Na extremidade superior da pipeta foi acoplado um filtro de ar e na extremidade inferior uma conexão tipo "T" com uma saída ligada ao frasco com o meio de crescimento e a outra ligada ao biorreator (Fig. 3.4). A bomba peristáltica foi instalada na mangueira de silicone que ligou a pipeta ao biorreator. Para determinar a vazão, o fluxo de meio de crescimento do frasco até a pipeta foi interrompido, sem desligar a bomba peristáltica, e a variação do volume na pipeta acompanhado com um cronômetro.

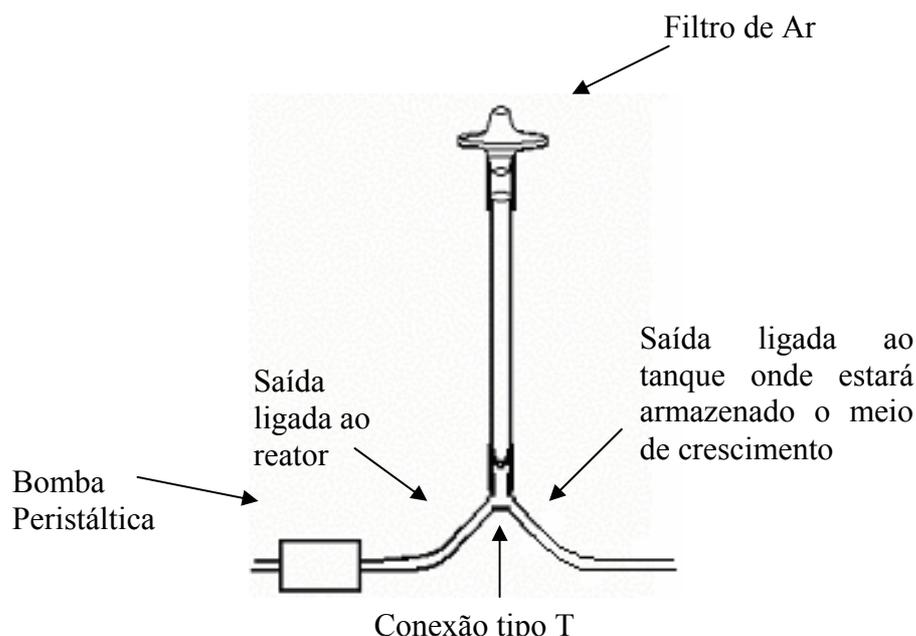


FIGURA 3.4: Sistema para medição da vazão volumétrica

### 3.8. Concentração de glicose e etanol

As concentrações de glicose e etanol foram acompanhadas por cromatografia líquida de alto desempenho com detector de índice de refração (Hewlett Packard, série 1100). A coluna utilizada foi uma Carbohydrate (6,5 mm x 300 mm, 10  $\mu$ m) da marca Beckman a 80°C, usando água, a uma vazão de 0,4 mL/min, como fase móvel. Nessas condições, os tempos de retenção da glicose e do etanol foram 11 e 17 minutos, respectivamente. Antes de serem analisadas, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm (Centrífuga Excelsa 2, Fanem Ltda., Modelo 205N) e filtradas em membrana com 47 mm de diâmetro e poros de 0,2  $\mu$ m.

### 3.9. Controle de contaminação

Foram realizados ensaios de controle de contaminação através de plaqueamento em meio sólido AN (Ágar Nutritivo - 10g/L de Peptona, 3g/L de Extrato

de Carne, 5g/L de NaCl, 15g/L de agar e pH entre 6,9 e 7,1). Para avaliar a presença de contaminantes, a amostra em estudo era inoculada em meio sólido AN e mantida por 48 horas a 33 °C. A bactéria *Zymomonas mobilis* não cresce neste meio. Testes de contaminação foram realizados em todas as fermentações.

### 3.10. Estudo Computacional

Para estudo computacional, foi utilizado um computador padrão IBM/PC, a fim de investigar o comportamento dinâmico através da elaboração dos diagramas de bifurcação e da simulação dinâmica do modelo cinético de crescimento estudado por LI (1995). Vários programas foram necessários para a realização da etapa computacional, pode-se destacar o programa para elaboração dos diagramas de bifurcação AUTO97 (DOEDEL, 1997) que é “freeware” (ver Apêndice II). O seguinte modelo foi estudado:

$$\frac{dX}{dt} = [\mu(S, P, Z) - D] \cdot X \quad 3.1$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot [S_F - S] - \frac{Q_P \cdot X}{Y_{P/S}} \quad 3.2$$

$$\frac{dP}{dt} = Q_P \cdot X - D \cdot P \quad 3.3$$

$$\frac{dZ}{dt} = \beta \cdot [W - Z] \quad 3.4$$

$$\frac{dW}{dt} = \beta \cdot [Q_P \cdot X - D \cdot P - W] \quad 3.5$$

$$\mu(S, P, Z) = \mu(S, P) \cdot f_\mu(Z(t)) \quad 3.6$$

$$f_\mu(Z(t)) = \frac{1}{2} \cdot \left( 1 - \frac{e^{\lambda \cdot Z(t) - \delta} - e^{-\lambda \cdot Z(t) + \delta}}{e^{\lambda \cdot Z(t) - \delta} + e^{-\lambda \cdot Z(t) + \delta}} \right) \quad 3.7$$

$$\mu(S, P) = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{ma}}\right)^a\right) \cdot f(P)}{k_s + \frac{S}{g(S)}} \quad 3.8$$

$$Q_P = \frac{Q_{P_{\max}} \cdot S}{k_{mP} + S} \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{me}}\right)^\alpha\right) \quad 3.9$$

onde  $f(P)$  é dado por

$$\begin{aligned} f(P) &= 1 & \text{se} & P \leq P_{ob}, \\ f(P) &= 1 - \left(\frac{P - P_{ob}}{P_{mb} - P_{ob}}\right)^b & \text{se} & P_{ob} \leq P < P_{mb}, \\ f(P) &= 0 & \text{se} & P > P_{mb} \end{aligned} \quad 3.10$$

onde  $g(S)$  é dado por

$$\begin{aligned} g(S) &= 1 & \text{se} & S \leq S_i, \\ g(S) &= \left(\frac{K_i - S_i}{(K_i - S_i) + (S - S_i)}\right) & \text{se} & S \geq S_i \end{aligned} \quad 3.11$$

# Capítulo 4

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultados Computacionais

A primeira parte deste trabalho foi o estudo do modelo proposto por LI *et al.* (1995) para descrever o crescimento do microrganismo *Zymomonas mobilis* ATCC 29129. Este estudo foi baseado na construção de diagramas de bifurcação e na realização de simulações dinâmicas. Os diagramas de bifurcação permitem avaliar a influência dos parâmetros de operação, como vazão e concentração de substrato limitante na alimentação ( $S_F$ ), sobre os estados estacionários previstos pelo modelo. Não foi objeto deste trabalho a realização de novas estimativas de parâmetros do modelo.

Durante as fermentações alcoólicas ocorre acúmulo de etanol no meio fermentado, que é responsável pela inibição do crescimento celular. LI *et al.* (1995) estudando a inibição causada pela história da concentração de etanol e pela taxa de variação da concentração de etanol, propuseram um modelo matemático para representar o comportamento oscilatório em fermentações contínuas de *Zymomonas mobilis*, uma vez que o modelo de Monod não possui tal característica. Os autores concluíram que a história da concentração de etanol não gera inibição ao contrário da taxa de variação da concentração de etanol.

O modelo em estudo (equações 3.1 a 3.11) é formado por um sistema de cinco equações diferenciais, sendo as três primeiras equações resultantes do balanço material considerando a operação em modo contínuo e por duas equações diferenciais resultantes da diferenciação de  $Z(t)$  com relação a  $t$ , tendo  $W(t)$  como uma variável

intermediária.  $Z$  é a média ponderada de segunda ordem da velocidade de variação da concentração de etanol.

$$\frac{dX}{dt} = [\mu(S, P, Z) - D] \cdot X \quad 3.1$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot [S_F - S] - \frac{Q_P \cdot X}{Y_{P/S}} \quad 3.2$$

$$\frac{dP}{dt} = Q_P \cdot X - D \cdot P \quad 3.3$$

$$\frac{dZ}{dt} = \beta \cdot [W - Z] \quad 3.4$$

$$\frac{dW}{dt} = \beta \cdot [Q_P \cdot X - D \cdot P - W] \quad 3.5$$

$$\mu(S, P, Z) = \mu(S, P) \cdot f_\mu(Z(t)) \quad 3.6$$

$$f_\mu(Z(t)) = \frac{1}{2} \cdot \left( 1 - \frac{e^{\lambda \cdot Z(t) - \delta} - e^{-\lambda \cdot Z(t) + \delta}}{e^{\lambda \cdot Z(t) - \delta} + e^{-\lambda \cdot Z(t) + \delta}} \right) \quad 3.7$$

$$\mu(S, P) = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot \left( 1 - \left( \frac{P}{P_{ma}} \right)^a \right) \cdot f(P)}{k_S + \frac{S}{g(S)}} \quad 3.8$$

$$Q_P = \frac{Q_{P_{\max}} \cdot S}{k_{mP} + S} \cdot \left( 1 - \left( \frac{P}{P_{me}} \right)^\alpha \right) \quad 3.9$$

onde  $f(P)$  é dado por

$$\begin{aligned} f(P) &= 1 & \text{se} & P \leq P_{ob}, \\ f(P) &= 1 - \left( \frac{P - P_{ob}}{P_{mb} - P_{ob}} \right)^b & \text{se} & P_{ob} \leq P < P_{mb} \\ f(P) &= 0 & \text{se} & P > P_{mb} \end{aligned} \quad 3.10$$

onde  $g(S)$  é dado por

$$\begin{aligned} g(S) &= 1 & \text{se} & S \leq S_i, \\ g(S) &= \left( \frac{K_i - S_i}{(K_i - S_i) + (S - S_i)} \right) & \text{se} & S \geq S_i \end{aligned} \quad 3.11$$

Efeitos como taxa de variação da concentração de etanol, limitação e inibição por substrato e inibição por produto têm sido considerados na modelagem de processos fermentativos na tentativa de representar os comportamentos dinâmicos observados experimentalmente (MONOD 1942, EDWARDS 1970, LI 1995). Os termos de limitação e inibição, considerados no modelo em estudo, foram propostos por VEERAMALLU e AGRAWAL (1990). Estes termos estão incluídos na equação da velocidade específica de crescimento.

Os parâmetros estimados para o modelo (Tabela 4.1) variaram com o comportamento dinâmico observado experimentalmente (LI, 1995). Os comportamentos observados foram classificados pelo autor como: estado estacionário, oscilação amortecida, oscilação sustentada e estado estacionário seguido por oscilação e retornando a estado estacionários. As condições 1, 2, 3 e 4 correspondem aos conjuntos de parâmetros usados nas simulações. O autor sentiu a necessidade de realizar uma nova estimativa, sempre que algum tipo de oscilação experimental fosse observado, seja amortecida ou sustentada. Observa-se que a maioria dos parâmetros são iguais (Tabela 4.1) e foram obtidos da literatura. Os parâmetros estimados foram  $a$ ,  $b$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\lambda$ ,  $\delta$  e  $q_{pmax}$ .

Os diagramas de bifurcação foram gerados com o programa AUTO97 (APÊNDICE 3) e as simulações dinâmicas foram desenvolvidas usando o método de Runge-Kutta clássico de quarta ordem num programa de álgebra computacional. Os diagramas de bifurcação foram gerados para célula ( $X$ ), substrato ( $S$ ) e produto ( $P$ ). A Tabela 4.1 apresenta os valores dos parâmetros estimados ou coletados da literatura por LI (1995) e usados neste trabalho para a construção dos diagramas de bifurcação e nas simulações dinâmicas.

TABELA 4.1: Parâmetros utilizados no modelo dinâmico em fermentações com *Zymomonas mobilis*

Parâmetro	Condição 1 Estado Estacionário	Condição 2 Oscilação Amortecida	Condição 3 Oscilação sustentada	Condição 4 Estacionário-Oscilação-Estacionário
Mumax	0,41	0,41	0,41	0,41
Pob	59	59	59	59
Pma	217	217	217	217
Pmb	108	108	108	108
Pme	120	120	120	120
Si	80	80	80	80
Ki	200	200	200	200
Ks	0,5	0,5	0,5	0,5
Kmp	0,2	0,2	0,2	0,2
Yps	0,495	0,495	0,495	0,495
Sf	150 e 187	187	200	200 e 100
A	0,6216	0,6216	0,3142	0,3168
B	0,5516	0,5516	1,415	2,127
Alpha	2,6	8,26	8,770	4,186
Beta	0,0767	0,0767	0,0366	0,0625
Lambda	3,8	3,8	21,05	3,988
Delta	7,8	7,8	0,8241	0,2251
Qpmax	4,2	3,150	2,613	2,95

Nos diagramas de bifurcação existem sempre dois ramos de soluções. O ramo representado pela reta horizontal, que consiste nas soluções triviais onde ocorre arraste celular, assim  $X = 0$  g/L,  $S = S_F$  g/L e  $P = 0$  g/L. O outro ramo representa os estados estacionários não triviais. As linhas contínuas representam estabilidade e as linhas descontínuas, instabilidade.

Para a condição 1 – Estado Estacionário (Tabela 4.1) em estudo, a taxa de diluição que limita a existência de um ou dois ramos de soluções é  $D_{L1} = 0,272$ . Para taxas de diluição menores que  $D_{L1}$  o arraste celular é instável e o ramo de soluções não-triviais apresenta pelo menos uma solução estável. É possível observar nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, que numa faixa estreita de taxas de diluição, próxima a  $D_{L1}$  (antes e depois), há três soluções não triviais previstas, sendo duas estáveis e uma instável. Para taxas de diluição maiores que  $D_{L1}$ , o arraste celular é estável já que nestas condições a velocidade de retirada de células é maior que a velocidade de crescimento. O confronto

entre os dados experimentais, obtidos da literatura, e os diagramas de bifurcação apresentou boa concordância. Os dados experimentais, obtidos da literatura, encontram-se no ANEXO 1.

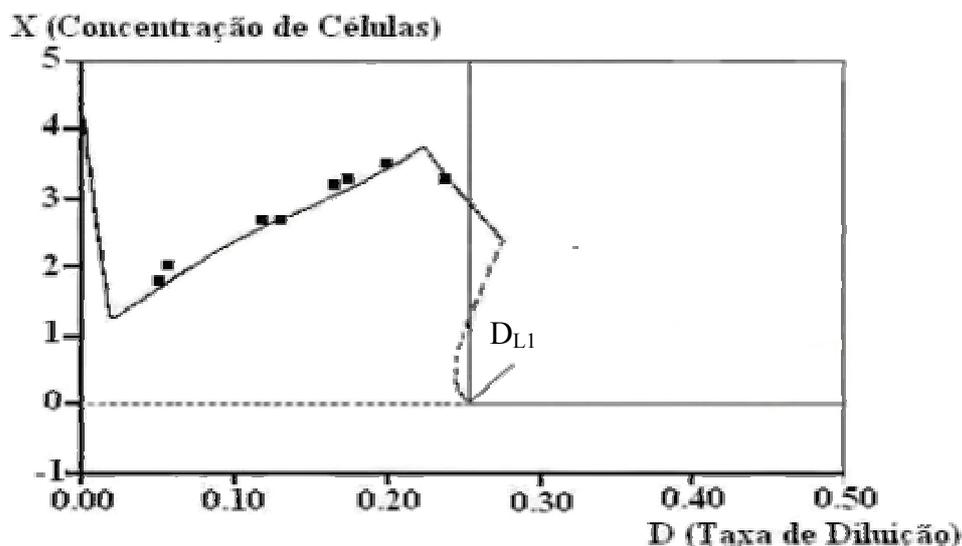


FIGURA 4.1: Diagrama de bifurcação da concentração de biomassa (X) – Condição 1:  $M_{\max} = 0,41$ ,  $p_{ob} = 59$ ,  $p_{ma} = 217$ ,  $p_{mb} = 108$ ,  $p_{me} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{mp} = 0,2$ ,  $y_{ps} = 0,495$ ,  $S_F = 150$ ,  $a = 0,6216$ ,  $b = 0,5516$ ,  $\alpha = 2,6$ ,  $\beta = 0,0767$ ,  $\lambda = 3,8$ ,  $\delta = 7,8$ ,  $q_{pmax} = 4,2$  (LI 1995). (■) Dados experimentais.

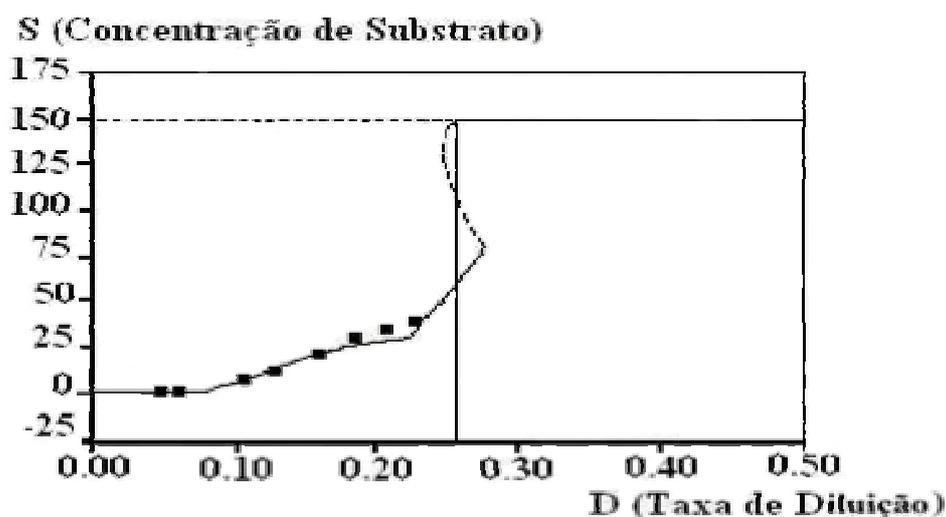


FIGURA 4.2: Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 1:  $M_{\max} = 0,41$ ,  $p_{ob} = 59$ ,  $p_{ma} = 217$ ,  $p_{mb} = 108$ ,  $p_{me} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{mp} = 0,2$ ,  $y_{ps} = 0,495$ ,  $S_F = 150$ ,  $a = 0,6216$ ,  $b = 0,5516$ ,  $\alpha = 2,6$ ,  $\beta = 0,0767$ ,  $\lambda = 3,8$ ,  $\delta = 7,8$ ,  $q_{pmax} = 4,2$  (LI 1995). (■) Dados experimentais

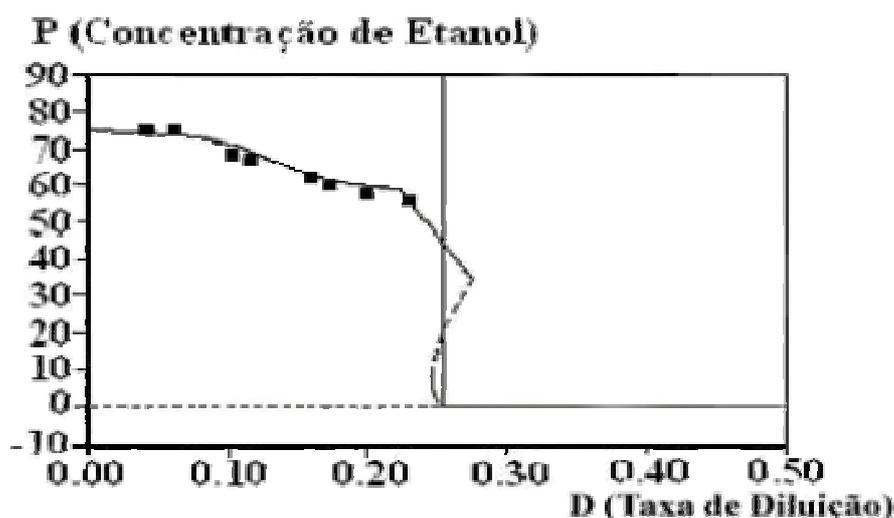


FIGURA 4.3: Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 1:  $\mu_{max} = 0,41$ ,  $p_{ob} = 59$ ,  $p_{ma} = 217$ ,  $p_{mb} = 108$ ,  $p_{me} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{mp} = 0,2$ ,  $y_{ps} = 0,495$ ,  $S_F = 150$ ,  $a = 0,6216$ ,  $b = 0,5516$ ,  $\alpha = 2,6$ ,  $\beta = 0,0767$ ,  $\lambda = 3,8$ ,  $\delta = 7,8$ ,  $q_{pmax} = 4,2$  (LI 1995). (■) Dados experimentais.

Nos diagramas de bifurcação da concentração de células em função da taxa de diluição observa-se um comportamento bem diferente do que prevê o modelo de Monod (Figura 4.4). A concentração de células no estado estacionário diminui à medida que a taxa de diluição também diminui. Este comportamento pode ser atribuído à limitação por substrato e à inibição por produto, previsto no modelo. No modelo proposto por Monod observa-se que a concentração de células no estado estacionário diminui com o aumento da taxa de diluição. Este modelo não considera efeitos de inibição.

Já os diagramas de substrato e de etanol apresentam um comportamento semelhante ao previsto por Monod considerando-se um acoplamento entre as velocidades de consumo de substrato e de formação de produto com a velocidade de crescimento celular. A concentração de etanol diminui com a taxa de diluição enquanto a concentração de substrato aumenta com a taxa de diluição. Este comportamento é observado até a taxa de diluição  $D_{L1} = 0,272$ , a partir da qual as concentrações de etanol

nos estados estacionários são iguais a zero e as concentrações de substrato nos estados estacionários são iguais à concentração de substrato limitante na alimentação (Figuras 4.2 e 4.3).

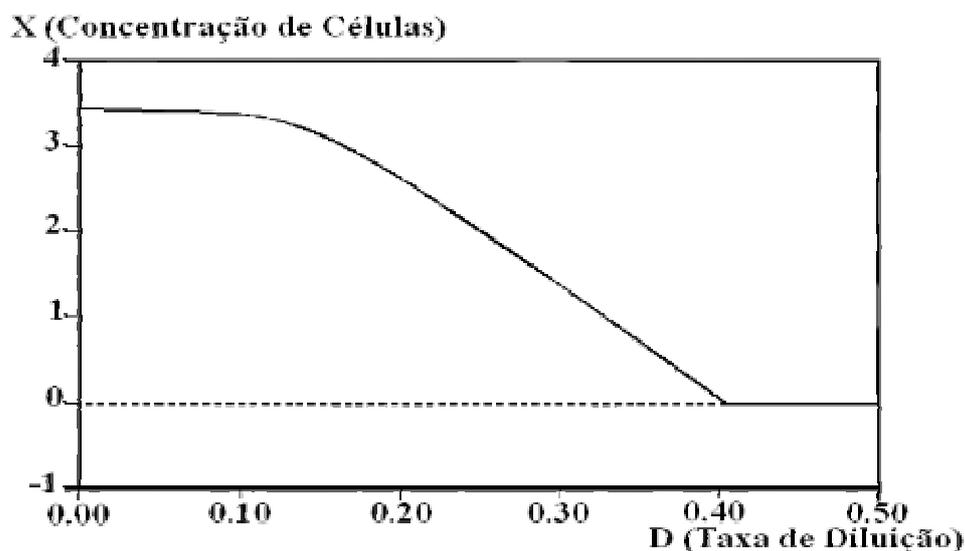


FIGURA 4.4: Diagramas de bifurcação da concentração de célula (X) proposto por Monod (1949).

Os diagramas de bifurcação obtidos com os parâmetros da condição 2-Oscilação Amortecida (Tabela 1) apresentam os mesmos perfis de comportamentos observados nos diagramas obtidos com os parâmetros da condição 1 (Figuras 4.5 - 4.7). Somente foi possível apresentar um único resultado experimental e este apresentou boa concordância com o diagrama de bifurcação. A taxa de diluição que limita a existência de um ou dois ramos de soluções é  $D_{L2}=0,2110$ .

Observa-se ainda que o valor de  $D_{L2}$  é menor do que o valor de  $D_{L1}$ , este fato pode ser explicado uma vez que o aumento da concentração de substrato na alimentação da condição 1 para a condição 2, implica em uma maior inibição por substrato e, conseqüentemente, menor valor de taxa de diluição a partir da qual ocorre a lavagem do biorreator ( $D_L$ ).

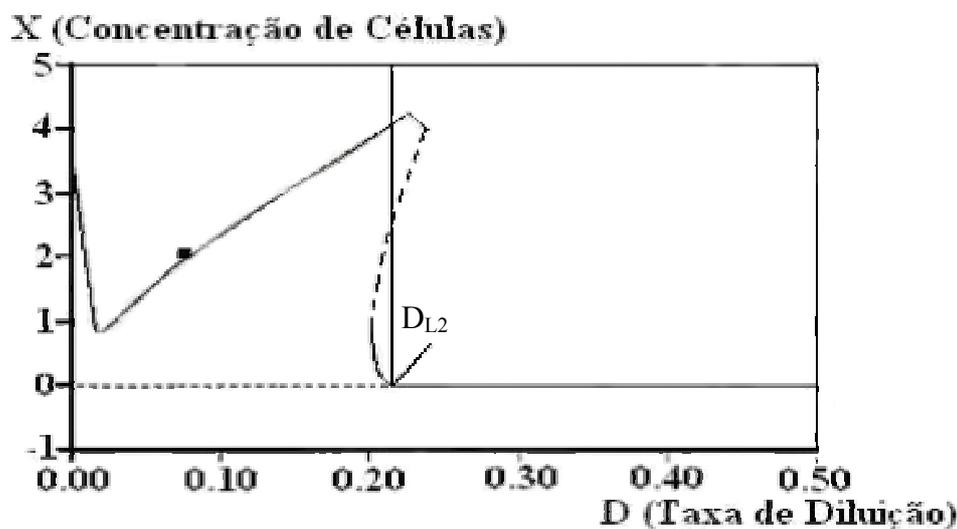


FIGURA 4.5: Diagrama de bifurcação da concentração de biomassa (X)– Condição 2:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_F = 187$ ,  $a = 0,6216$ ,  $b = 0,5516$ ,  $\alpha = 8,26$ ,  $\beta = 0,0767$ ,  $\lambda = 3,8$ ,  $\delta = 7,8$ ,  $q_{\text{pmax}} = 3,150$  (LI 1995). (■) Dado experimental –  $X = 2,199$  g/L com  $D = 0,0879$  h<sup>-1</sup>.

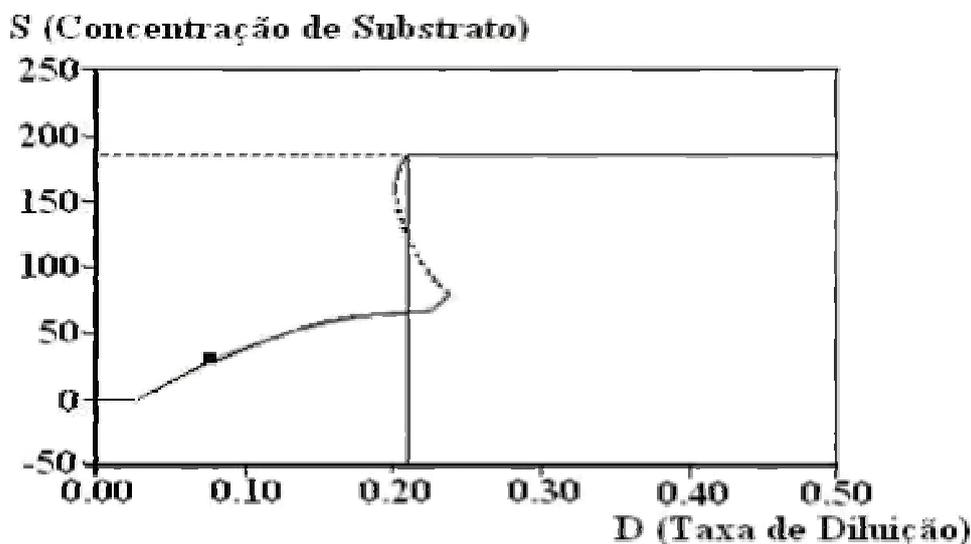


FIGURA 4.6: Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S)– Condição 02:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_F = 187$ ,  $a = 0,6216$ ,  $b = 0,5516$ ,  $\alpha = 8,26$ ,  $\beta = 0,0767$ ,  $\lambda = 3,8$ ,  $\delta = 7,8$ ,  $q_{\text{pmax}} = 3,150$  (LI 1995). (■) Dado experimental –  $S = 28,23$  g/L com  $D = 0,0879$  h<sup>-1</sup>.

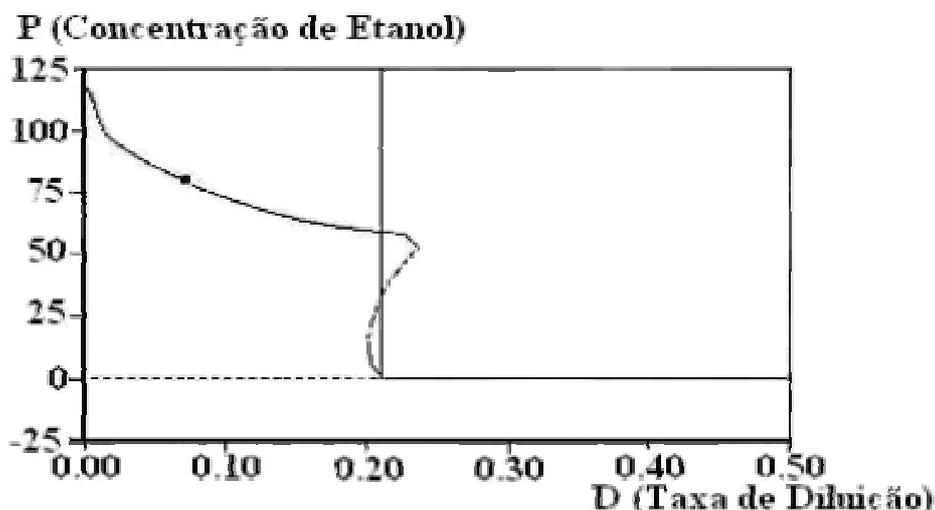


FIGURA 4.7: Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P)– Condição 02:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_F = 187$ ,  $a = 0,6216$ ,  $b = 0,5516$ ,  $\alpha = 8,26$ ,  $\beta = 0,0767$ ,  $\lambda = 3,8$ ,  $\delta = 7,8$ ,  $q_{\text{pmax}} = 3,150$  (LI 1995). (■) Dado experimental –  $S = 79,31$  g/L com  $D = 0,0879$  h<sup>-1</sup>.

Os parâmetros que diferem a condição 1 da condição 2 são apenas dois,  $\alpha$  e  $q_{\text{pmax}}$  (parâmetros estimados), além de  $S_F$  que é a concentração de substrato na alimentação. Os diagramas de bifurcação gerados com os parâmetros da condição 1, porém sendo utilizado uma segunda concentração de substrato,  $S_F = 187$ , que é igual ao valor da taxa de diluição da condição 2, são apresentados nas Figuras 4.8, 4.9 e 4.10. Observa-se que os parâmetros da condição 1, com  $S_F = 187$  (condição 2), permitem gerar diagramas que apresentam boa concordância com o resultado experimental de oscilação amortecida.

Como já foi dito, não fez parte dos objetivos deste trabalho a realização de estimativas de parâmetros que pudessem representar todos os comportamentos observados com um único conjunto de parâmetros estimados. De qualquer forma, os resultados que acabam de ser apresentados dão indícios de que isto seria possível, além de ratificar a importância da construção de diagramas de bifurcação para a validação da modelagem.

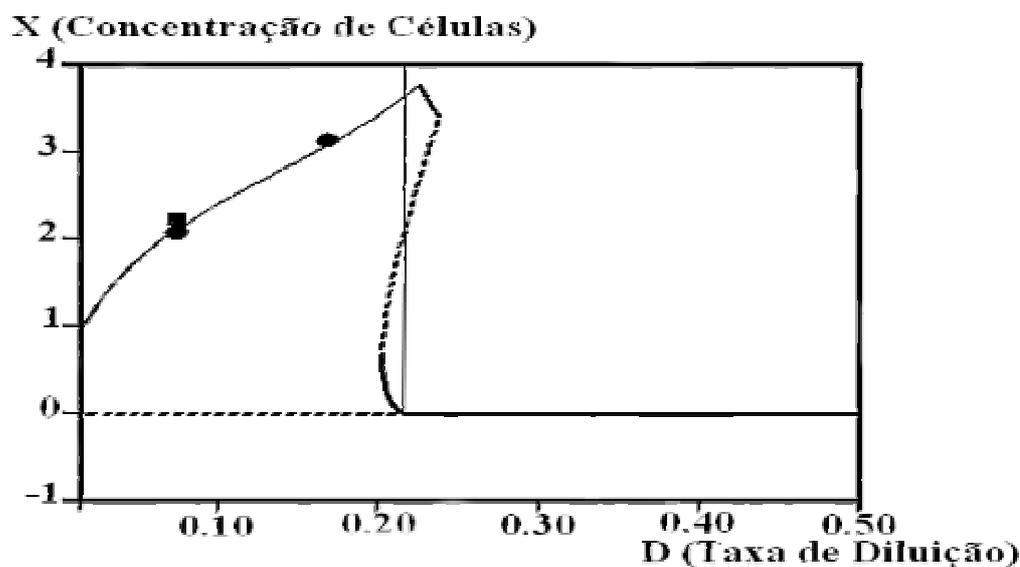


FIGURA 4.8: Diagrama de bifurcação da concentração de células (X) – Condição 01:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_f = 187$ ,  $a = 0,6216$ ,  $b = 0,5516$ ,  $\alpha = 2,6$ ,  $\beta = 0,0767$ ,  $\lambda = 3,8$ ,  $\delta = 7,8$ ,  $q_{\text{pmax}} = 4,2$  (LI 1995). (■) Dado experimental – OA –  $X = 2,199 \text{ g/L}$  com  $D = 0,0879 \text{ h}^{-1}$ . (●) Dado experimental – EE –  $X = 2,147 \text{ g/L}$  com  $D = 0,0879$  e  $X = 3,001 \text{ g/L}$  com  $D = 0,174 \text{ h}^{-1}$ .

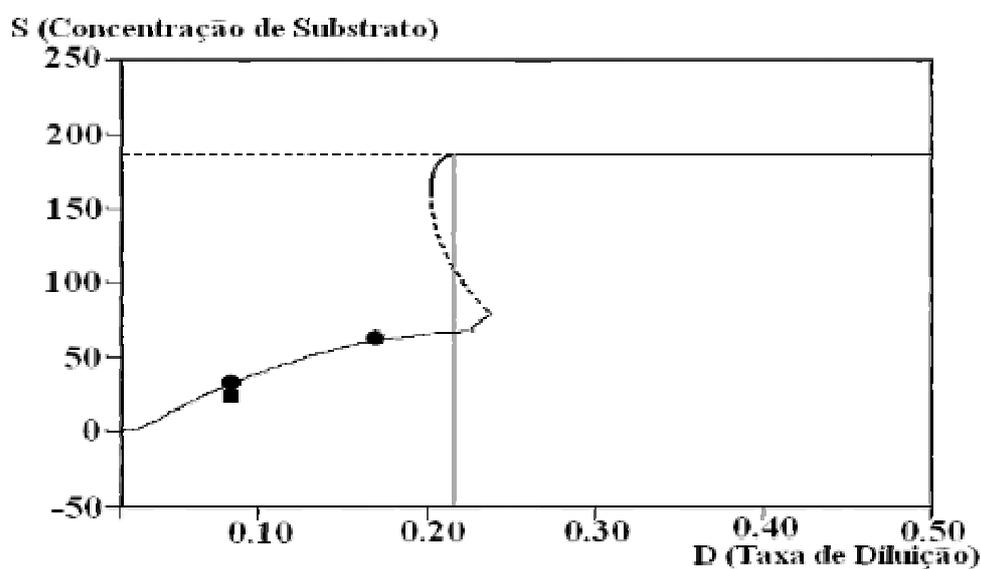


FIGURA 4.9: Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 01:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_f = 187$ ,  $a = 0,6216$ ,  $b = 0,5516$ ,  $\alpha = 2,6$ ,  $\beta = 0,0767$ ,  $\lambda = 3,8$ ,  $\delta = 7,8$ ,  $q_{\text{pmax}} = 4,2$  (LI 1995). (■) Dado experimental – OA –  $S = 28,23 \text{ g/L}$ ,  $D = 0,0879 \text{ h}^{-1}$ . (●) Dado experimental – EE –  $S = 30,33 \text{ g/L}$  com  $D = 0,0879$  e  $S = 74,21 \text{ g/L}$  com  $D = 0,174 \text{ h}^{-1}$ .

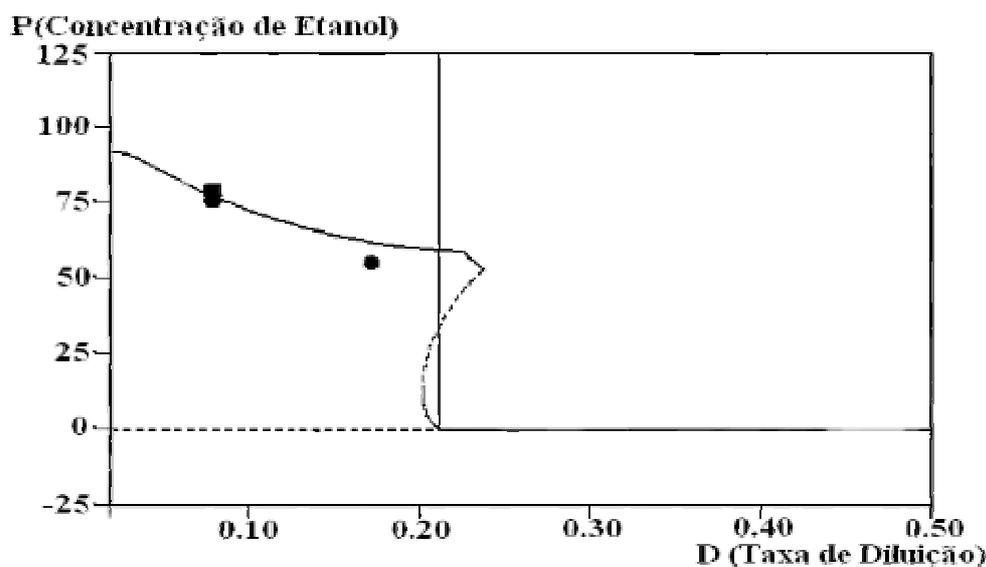


FIGURA 4.10: Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 01:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_F = 187$ ,  $a = 0,6216$ ,  $b = 0,5516$ ,  $\alpha = 2,6$ ,  $\beta = 0,0767$ ,  $\lambda = 3,8$ ,  $\delta = 7,8$ ,  $q_{\text{pmax}} = 4,2$  (LI 1995). (■) Dado experimental -AO-  $P = 79,31 \text{ g/L}$ ,  $D = 0,0879 \text{ h}^{-1}$ . (●) Dado experimental -EE -  $P = 77,18 \text{ g/L}$  com  $D = 0,0879$  e  $P = 56,10 \text{ g/L}$  com  $D = 0,174 \text{ h}^{-1}$ .

A mudança da concentração de substrato na alimentação ( $S_F$ ), que pode ser encarado como um segundo parâmetro de continuação, promove mudanças no comportamento dos diagramas de bifurcação. A Figura 4.11 apresenta diagramas de bifurcação gerados com os parâmetros da condição 1 para diferentes valores de  $S_F$  (100 g/L, 187 g/L, 200 g/L).

Os diagramas de bifurcação obtidos com os parâmetros das condições 3 e 4 (Tabela 4.1) apresentam pontos de bifurcação de Hopf, a partir dos quais surgem soluções oscilatórias (Figuras 4.12 – 4.14 e Figuras 4.15 – 4.17). O ponto 1 ( $D = 0,1115 \text{ h}^{-1}$  e  $D = 0,0776 \text{ h}^{-1}$  para a condição 3 e 4 respectivamente), é chamado, particularmente, de ponto de Hopf supercrítico, pois há uma perda de estabilidade da solução sendo acompanhada pelo aparecimento de oscilações com amplitudes pequenas. Entre os pontos 1 e 2, que corresponde a duas condições de operação, são previstas soluções periódicas estáveis. A bifurcação que ocorre no ponto 2 ( $D = 0,0423 \text{ h}^{-1}$  e  $D = 0,0688 \text{ h}^{-1}$  para a condição 3 e 4 respectivamente) é classificada de bifurcação de Hopf

subcrítica, caracterizada pelo aparecimento de oscilação de amplitudes grandes. Os pontos 3 e 4 representam bifurcação de dobra no ciclo limite. Eles correspondem à taxa de diluição na qual a solução periódica muda de estabilidade. Para taxas de diluição entre  $0,0423 \text{ h}^{-1}$  e  $0,0357 \text{ h}^{-1}$  (pontos 2 e 3) coexistem soluções periódicas estáveis e instáveis. Para taxas de diluição menores que  $0,0357$  (ponto 3) o modelo prevê estados estacionários. O confronto entre os dados experimentais e os diagramas de bifurcação apresentou boa concordância.

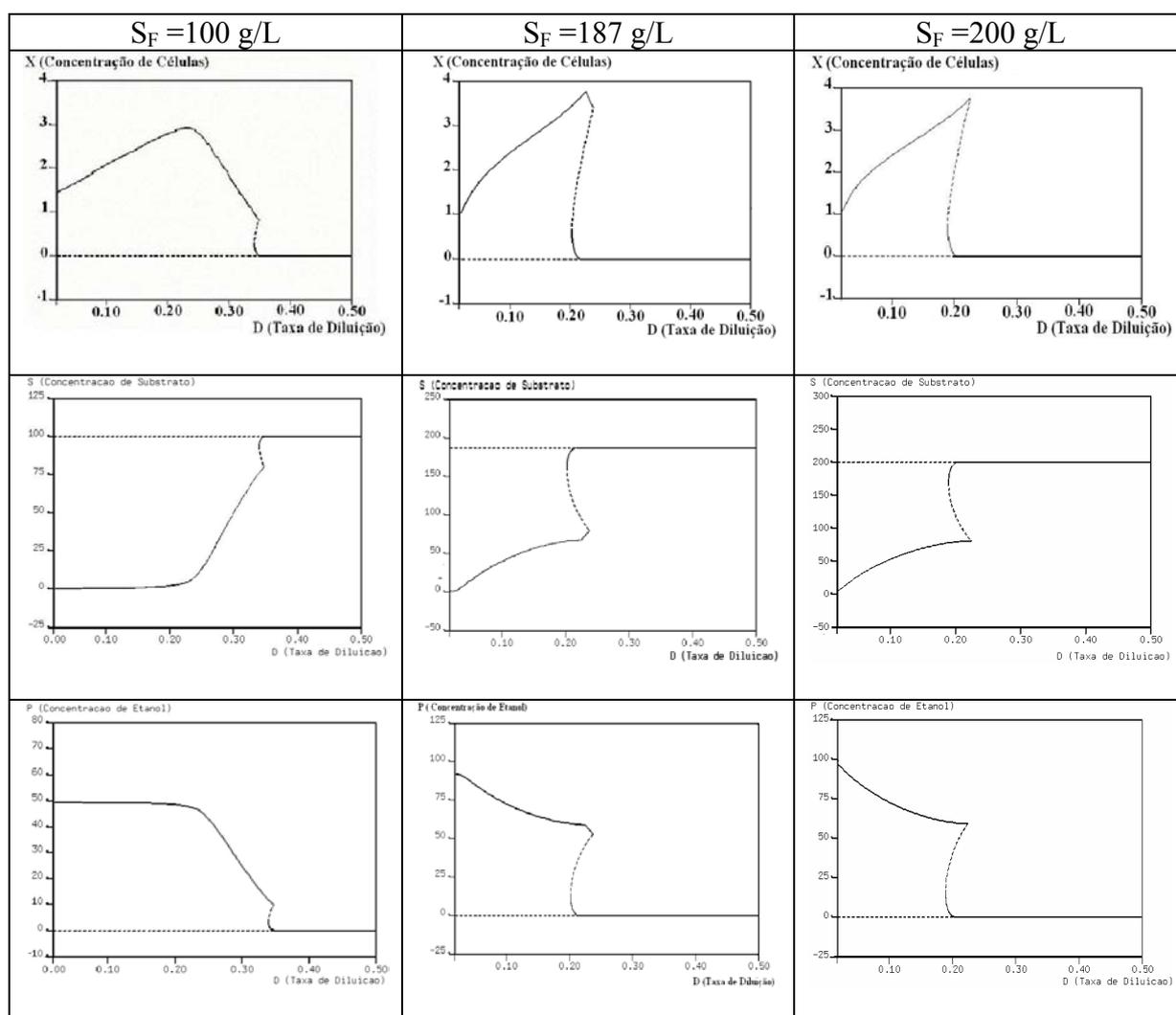


FIGURA 4.11: Diagramas de bifurcação com diferentes valores para concentração de alimentação.

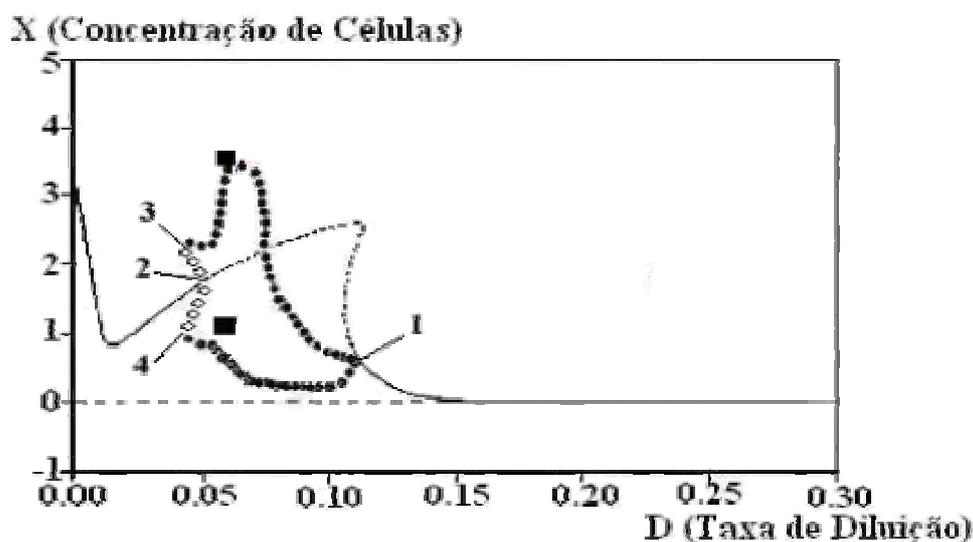


FIGURA 4.12: Diagrama de bifurcação da concentração de célula ( $X$ ) – Condição 3:  $M_{umax} = 0,41$ ,  $pob = 59$ ,  $pma = 217$ ,  $pmb = 108$ ,  $pme = 120$ ,  $si = 80$ ,  $ki = 200$ ,  $ks = 0,5$   $kmp = 0,2$ ,  $yps = 0,495$ ,  $S_F = 200$ ,  $a = 0,3142$ ,  $b = 1,415$ ,  $\alpha = 8,770$ ,  $\beta = 0,0366$ ,  $\lambda = 21,05$ ,  $\delta = 0,8241$ ,  $qpmax = 2,613$  (LI 1995). (■) Dados experimentais –  $X_{m\acute{a}x} = 3,415$  g/L e  $X_{m\acute{i}n} = 1,315$ g/L com  $D = 0,06$  h<sup>-1</sup>.

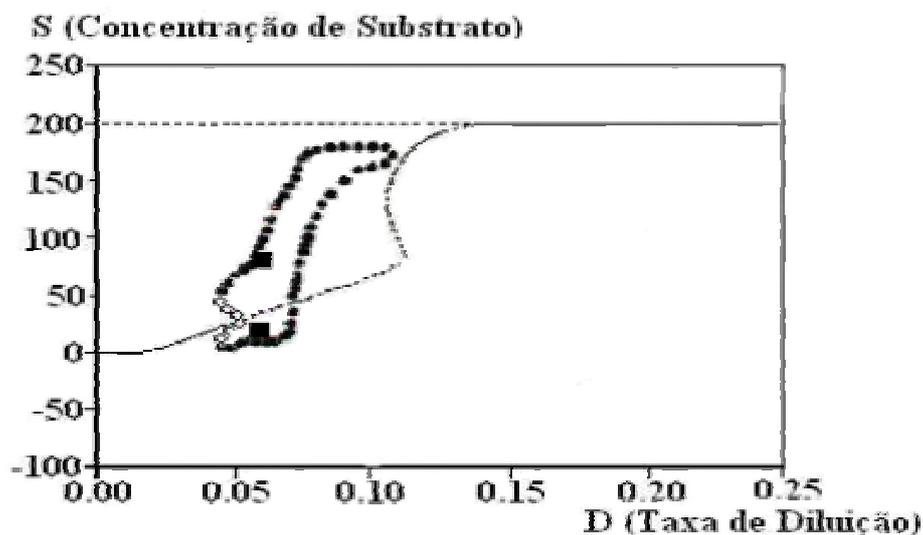


FIGURA 4.13: Diagrama de bifurcação da concentração de substrato ( $S$ ) – Condição 3:  $M_{umax} = 0,41$ ,  $pob = 59$ ,  $pma = 217$ ,  $pmb = 108$ ,  $pme = 120$ ,  $si = 80$ ,  $ki = 200$ ,  $ks = 0,5$   $kmp = 0,2$ ,  $yps = 0,495$ ,  $S_F = 200$ ,  $a = 0,3142$ ,  $b = 1,415$ ,  $\alpha = 8,770$ ,  $\beta = 0,0366$ ,  $\lambda = 21,05$ ,  $\delta = 0,8241$ ,  $qpmax = 2,613$  (LI 1995). (■) Dados experimentais –  $S_{m\acute{a}x} = 80,70$  g/L e  $S_{m\acute{i}n} = 21,27$  g/L com  $D = 0,06$  h<sup>-1</sup>.

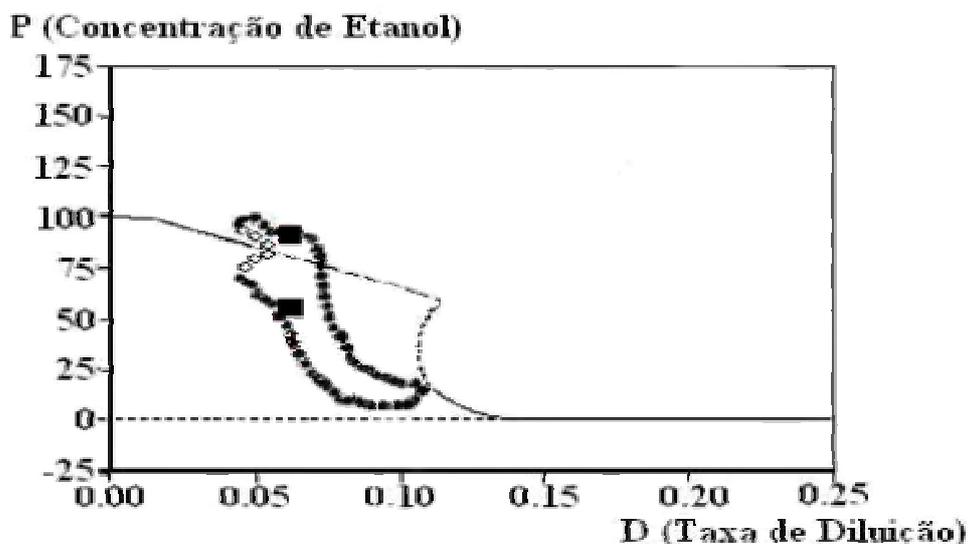


FIGURA 4.14: Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 3:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_F = 200$ ,  $a = 0,3142$ ,  $b = 1,415$ ,  $\alpha = 8,770$ ,  $\beta = 0,0366$ ,  $\lambda = 21,05$ ,  $\delta = 0,8241$ ,  $q_{\text{pmax}} = 2,613$  (LI 1995). (■) Dados experimentais –  $P_{\text{máx}} = 92,59$  g/L e  $P_{\text{mín}} = 61,64$  g/L com  $D = 0,06$  h<sup>-1</sup>.

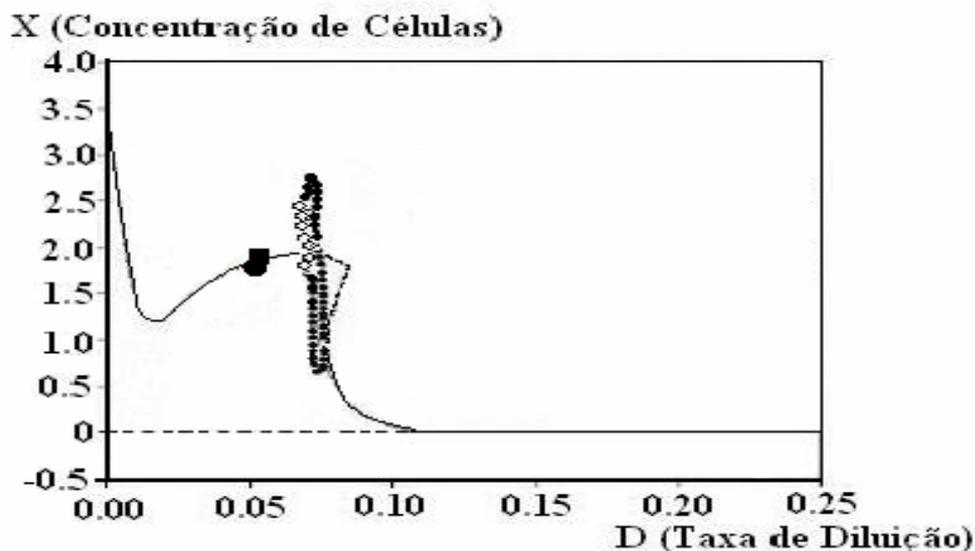


FIGURA 4.15: Diagrama de bifurcação da concentração de células (X) – Condição 4:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_F = 200$ ,  $a = 0,3168$ ,  $b = 2,127$ ,  $\alpha = 4,186$ ,  $\beta = 0,0625$ ,  $\lambda = 3,988$ ,  $\delta = 0,2251$ ,  $q_{\text{pmax}} = 2,95$  (LI 1995). (●) Dado experimental –  $X = 1,823$  g/L com  $D = 0,0517$  h<sup>-1</sup>. (■) Dado experimental –  $X = 1,895$  g/L com  $D = 0,0587$  h<sup>-1</sup>.

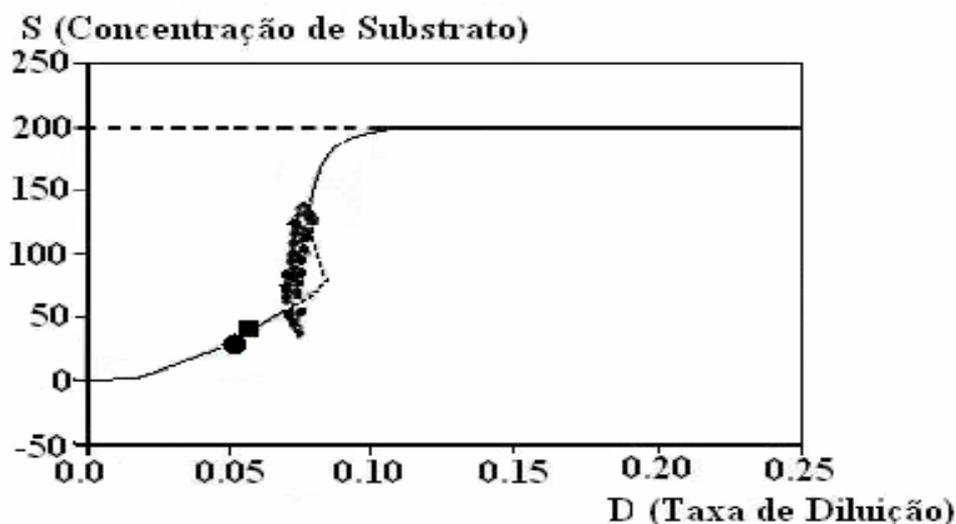


FIGURA 4.16: Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 4:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_f = 200$ ,  $a = 0,3168$ ,  $b = 2,127$ ,  $\alpha = 4,186$ ,  $\beta = 0,0625$ ,  $\lambda = 3,988$ ,  $\delta = 0,2251$ ,  $q_{\text{pmax}} = 2,95$  (LI 1995). (●) Dado experimental –  $S = 31,75$  g/L com  $D = 0,0517$  h<sup>-1</sup>. (■) Dado experimental –  $S = 43,27$  g/L com  $D = 0,0587$  h<sup>-1</sup>.

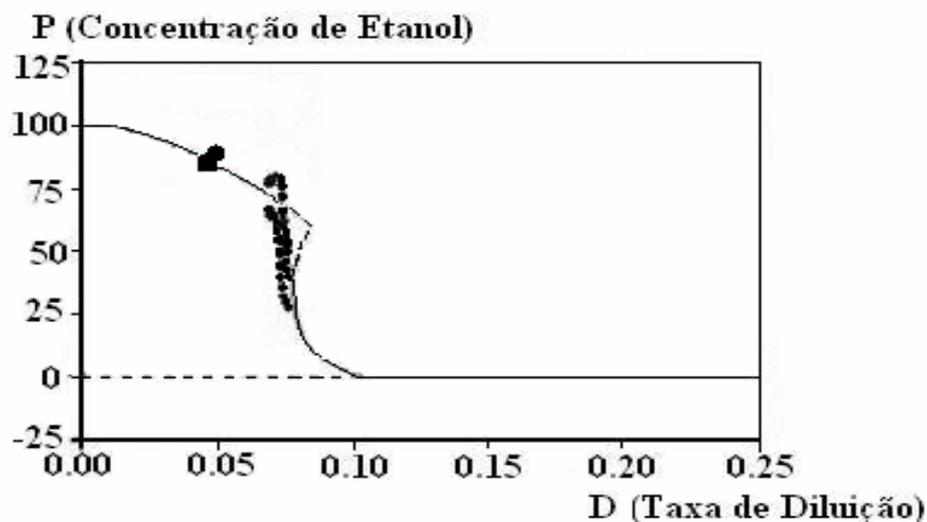


FIGURA 4.17: Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 4:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_f = 200$ ,  $a = 0,3168$ ,  $b = 2,127$ ,  $\alpha = 4,186$ ,  $\beta = 0,0625$ ,  $\lambda = 3,988$ ,  $\delta = 0,2251$ ,  $q_{\text{pmax}} = 2,95$  (LI 1995). (●) Dado experimental –  $P = 85,75$  g/L com  $D = 0,0517$  h<sup>-1</sup>. (■) Dado experimental –  $P = 81,73$  g/L com  $D = 0,0587$  h<sup>-1</sup>.

Simulações dinâmicas foram realizadas com os parâmetros da condição 3 exemplificando os diferentes tipos de comportamento dinâmico previstos para

diferentes valores de taxa de diluição (Figura 4.18). Foram realizadas simulações com três taxas de diluição ( $D = 0,02 \text{ h}^{-1}$ ,  $D = 0,07 \text{ h}^{-1}$  e  $D = 0,012 \text{ h}^{-1}$ ). A taxa de diluição  $D = 0,07 \text{ h}^{-1}$  leva o sistema a um comportamento oscilatório enquanto as demais a estados estacionários

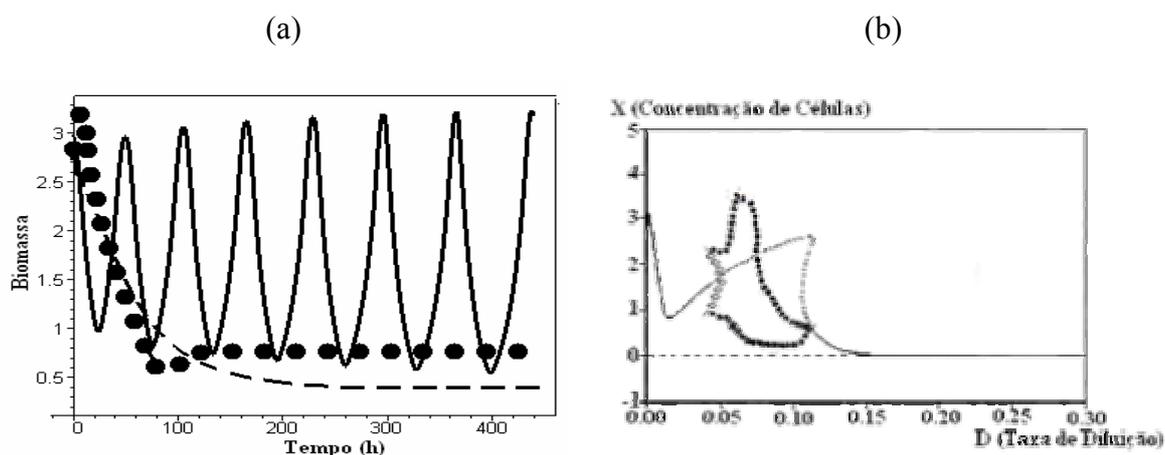


FIGURA 4.18: (a) Simulação dinâmica da condição 3 com diferente taxas de diluição: (●)  $D = 0,02$ , (—)  $D = 0,07$  e (---)  $D = 0,14$ . (b) Diagrama de bifurcação da condição 3.

Através das simulações dinâmicas observou-se também que as oscilações classificadas como sustentadas na literatura (LI, 1995) são, na realidade, amortecidas segundo o próprio modelo usado pelo autor. Comparando-se os diagramas de bifurcação gerados a partir os parâmetros da condição 4 com os pontos experimentais obtidos da literatura (LI, 1995), observa-se que estes estão em uma região do diagrama para a qual o modelo prevê um estado estacionário estável e não numa solução oscilatória, conforme apresentado na literatura. Simulações foram realizadas para confirmar essas observações. A Figura 4.19 apresenta as simulações dinâmicas para biomassa, glicose e etanol. A concentração de substrato na alimentação e as taxas de diluição foram as mesmas utilizadas experimentalmente pelo autor, ou seja,  $S_F = 200 \text{ g/L}$  com  $D = 0,0517$  e  $D = 0,0587 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ . A primeira taxa de diluição foi utilizada pelo autor por 110 minutos e a segunda por mais 140 minutos, períodos para os quais o autor concluiu que se

tratava de oscilação sustentada. Conforme se pode ver através das simulações da apresentadas nas Figura 4.19, as oscilações, previstas pelo modelo, são na realidade amortecidas.

As linhas verticais marcam o tempo máximo acompanhado pelos autores, tanto experimentalmente quanto através de simulação. Quando a simulação é acompanhada por 500 horas, observa-se que se trata de oscilações amortecidas. Estes resultados ratificam os diagramas de bifurcação, gerados neste trabalho, que prevêm estado estacionário estável para condições de operação, classificadas por Li (1995), como responsáveis pela oscilação do sistema.

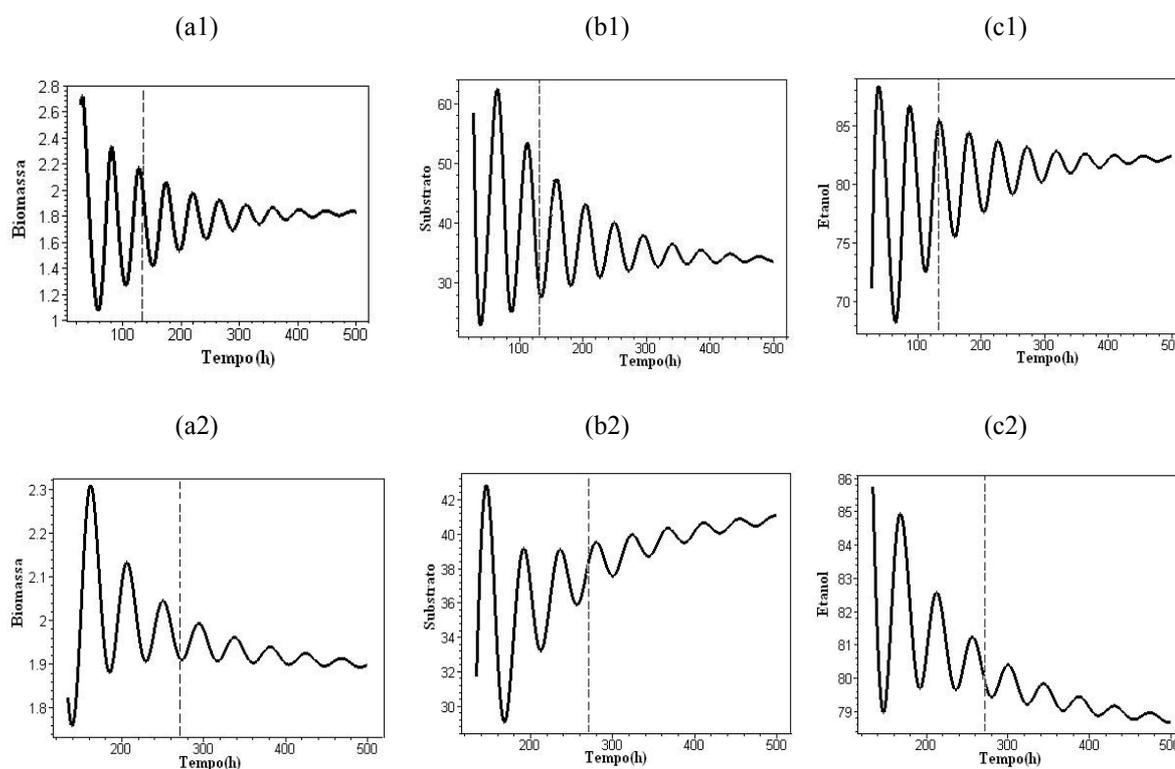


FIGURA 4.19: Simulação Dinâmica da condição 04 em estudo. (a1) – Biomassa com  $D = 0,0517 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ ,  $S_F = 200 \text{ g/L}$ ; (a2) – Biomassa com  $D = 0,0587 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ ,  $S_F=200\text{g/L}$ ; (b1) - Substrato com  $D=0,0517 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ ,  $S_F = 200 \text{ g/L}$ ; (b2) – Substrato com  $D=0,0587 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ ,  $S_F=200\text{g/L}$ ; (c1) – Produto com  $D=0,0517 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ ,  $S_F = 200 \text{ g/L}$ ; (c2) – Produto com  $D=0,0587 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ ,  $S_F=200\text{g/L}$ .

## 4.2. Resultados Experimentais

### 4.2.1. Fermentação em Batelada

O estudo computacional do modelo para o crescimento da bactéria *Z. mobilis* permitiu conhecer o comportamento dinâmico de fermentações contínuas, desta bactéria, em diferentes condições de operação. De posse desta informação, foram realizados experimentos em batelada e contínuos.

Devido à necessidade de trabalhar com uma linhagem da bactéria diferente daquela usada por LI (1995) (trabalho referência), foi realizada uma fermentação em batelada (FB) para determinar a velocidade específica de crescimento. A fermentação foi finalizada ao completar 24 horas de processo quando não havia mais crescimento. A curva de crescimento foi tipicamente exponencial, conforme gráficos semilog gerados, apresentando uma mudança neste perfil somente nas últimas horas de fermentação (Figura 4.20). A velocidade específica de crescimento obtida foi de  $0,1166 \text{ h}^{-1}$ . Esta taxa é inferior às taxas obtidas por VEERMALLU e AGRAWAL (1990) que são de aproximadamente,  $0,19 \text{ h}^{-1}$ . O rendimento de glicose em células foi de  $0,005 \text{ g/g}$ .

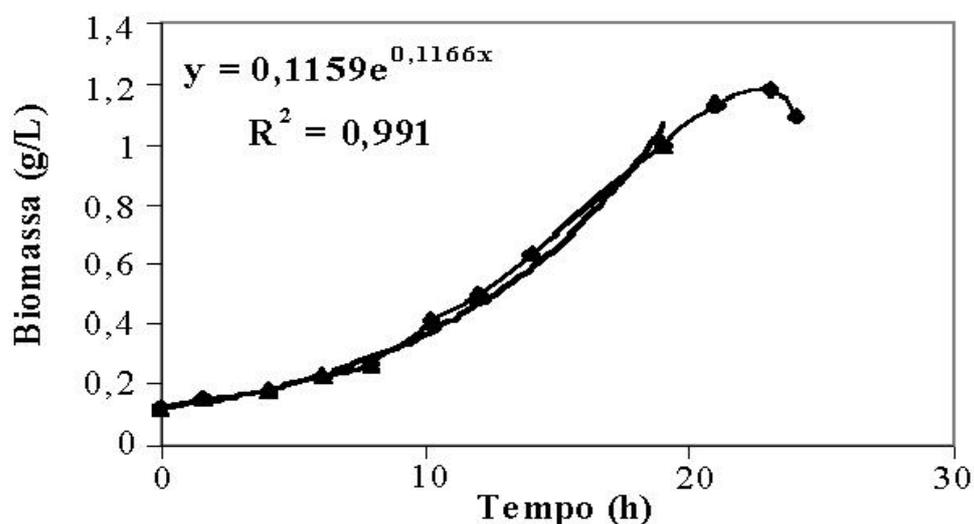


Figura 4.20 - Determinação da velocidade específica de crescimento.

#### 4.2.2. Fermentações Contínuas

As fermentações contínuas foram realizadas conforme procedimento apresentado no capítulo 3, e utilizaram as mesmas condições da literatura, LI (1995). As taxas de diluição utilizadas nas fermentações contínuas foram  $0,06\text{h}^{-1}$ ,  $0,0675\text{h}^{-1}$  e  $0,07\text{h}^{-1}$ , a agitação, a temperatura e o pH foram mantidos, respectivamente, em 150 rpm,  $30^{\circ}\text{C}$  e 5,0.

A Fermentação 1 transcorreu como batelada por 29,16 horas. A partir deste instante, foi iniciada a alimentação do meio de crescimento (Tabela 4.4) a uma vazão de  $0,8\text{ mL/min}$  ( $D = 0,06\text{h}^{-1}$ ,  $T_R = 16,66\text{ h}$ ), dando início ao processo contínuo. O sistema atingiu o estado estacionário com, aproximadamente, 65 horas de fermentação. O processo foi mantido em estado estacionário por, aproximadamente, 5 tempos de residência. As Figuras 4.21 a 4.23 apresentam as curvas de biomassa, substrato e etanol da Fermentação 1.

TABELA 4.2 – Condições de operação da Fermentação 1.

TEMPO (h)	D ( $\text{h}^{-1}$ )	$S_F$ (g/L)	Tempo de residência
0,0 – 29,16	FERMENTAÇÃO BATELADA		-
29,16 – 151	0,06	200	16,66

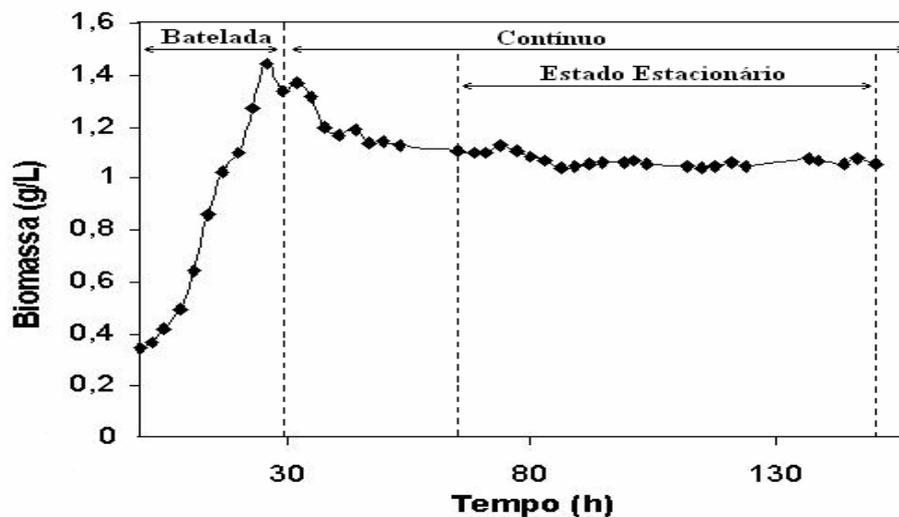


FIGURA 4.21: Fermentação 1 – Biomassa – Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,06h^{-1}$ ).

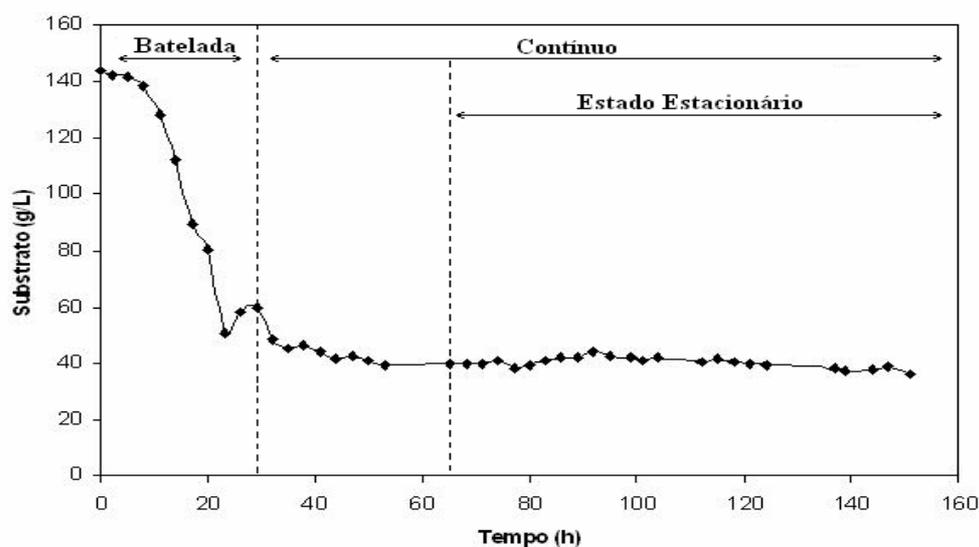


FIGURA 4.22: Fermentação 1 – Substrato – Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,06h^{-1}$ ).

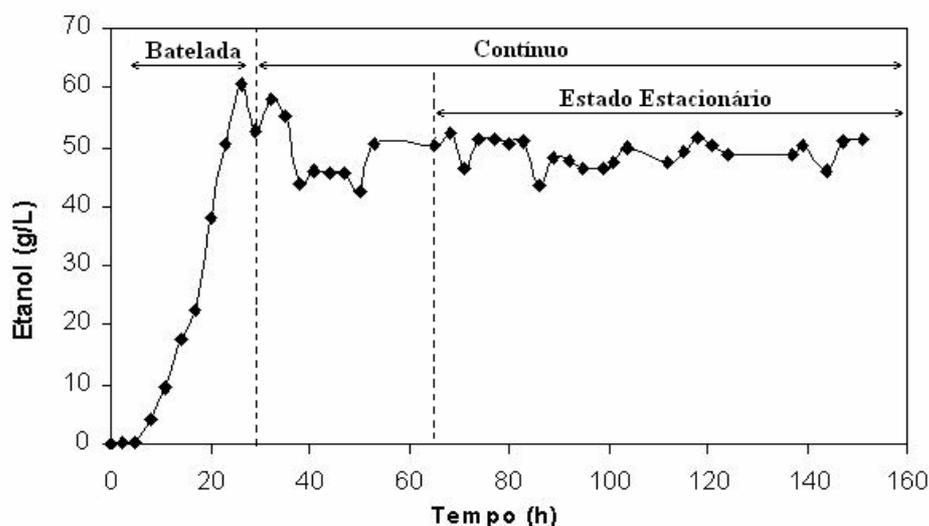


FIGURA 4.23: Fermentação 1 – Etanol - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,06h^{-1}$ ).

Uma nova fermentação foi realizada (Fermentação 2), transcorrendo como batelada por 35,75 horas, quando foi iniciada a alimentação do meio de crescimento (Tabela 4.3) a uma vazão de 0,9 mL/min ( $D = 0,0675 h^{-1}$ ,  $T_R = 14,81 h$ ) dando início ao processo contínuo. O processo foi mantido em estado estacionário por, aproximadamente, 6,5 tempos de residência. As Figuras 4.24 a 4.26 apresentam as curvas de biomassa, substrato e etanol da Fermentação 2.

TABELA 4.3 – Condições de operação da Fermentação 2.

TEMPO (h)	D ( $h^{-1}$ )	$S_F$ (g/L)	Tempo de residência
0,0 – 35,75	FERMENTAÇÃO BATELADA		-
35,75 – 238	0,0675	200	14,81

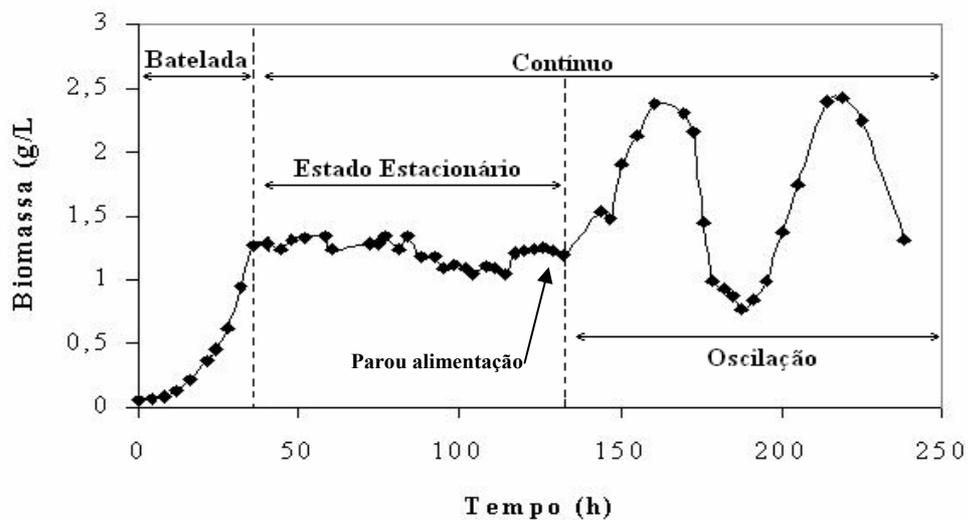


FIGURA 4.24: Fermentação 2 – Biomassa - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,0675h^{-1}$ ).

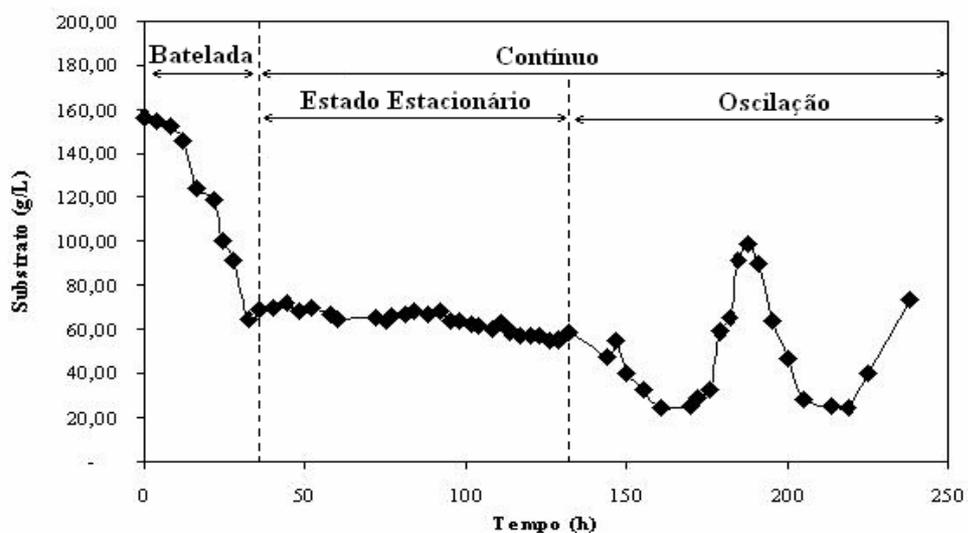


FIGURA 4.25: Fermentação 2 – Substrato - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,0675h^{-1}$ ).

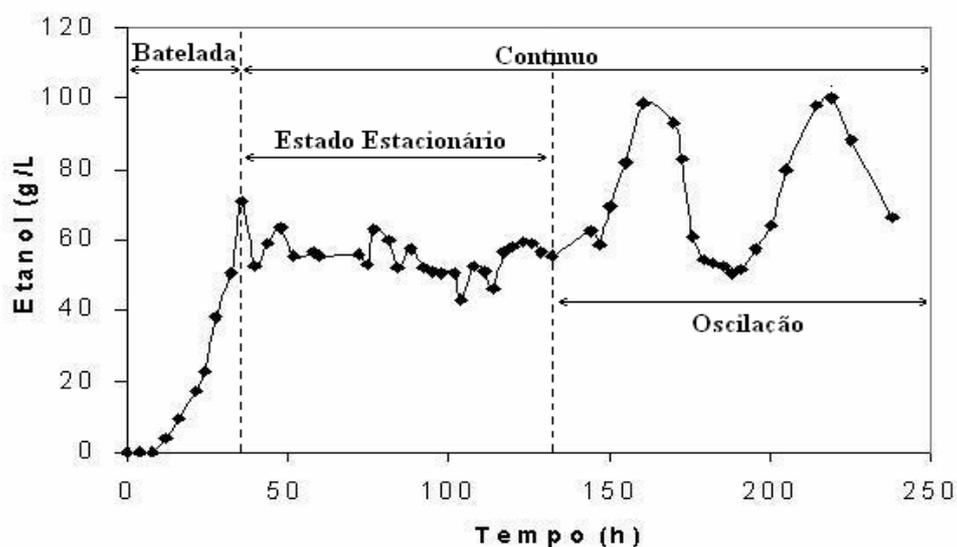


FIGURA 4.26: Fermentação 2 – Etanol - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,0675h^{-1}$ ).

Depois de iniciado o processo contínuo o sistema apresentou comportamento de estado estacionário durante 96,25 horas passando em seguida para um comportamento oscilatório por 106 horas. Durante o comportamento estacionário houve falta de alimentação do meio durante 3 horas após 93,25 horas de fermentação. Uma vez restabelecida a alimentação do processo, observa-se uma variação da concentração de células que leva a um comportamento oscilatório. Durante o período em que o fermentador deixou de ser alimentado, não houve consumo total do substrato que estava no fermentador.

Uma terceira fermentação (Fermentação 3) foi realizada, transcorrendo como batelada por 22,50 horas, quando foi iniciada a alimentação do meio de crescimento (Tabela 4.4) a uma vazão de 0,93 mL/min ( $D = 0,07 h^{-1}$ ,  $T_R = 14,28 h$ ). O sistema atingiu o estado estacionário com, aproximadamente, 53 horas de fermentação, dando início ao processo contínuo. O processo foi mantido em estado estacionário por, aproximadamente, 6,5 tempos de residência. As Figuras 4.27 a 4.29 apresentam as curvas de biomassa, substrato e etanol da Fermentação 3.

TABELA 4.4 – Condições de operação da Fermentação 3

TEMPO (h)	D (h <sup>-1</sup> )	S <sub>F</sub> (g/L)	Tempo de residência(h)
0,0 – 22,50	FERMENTAÇÃO BATELADA		-
22,50 – 145	0,07	200	14,28

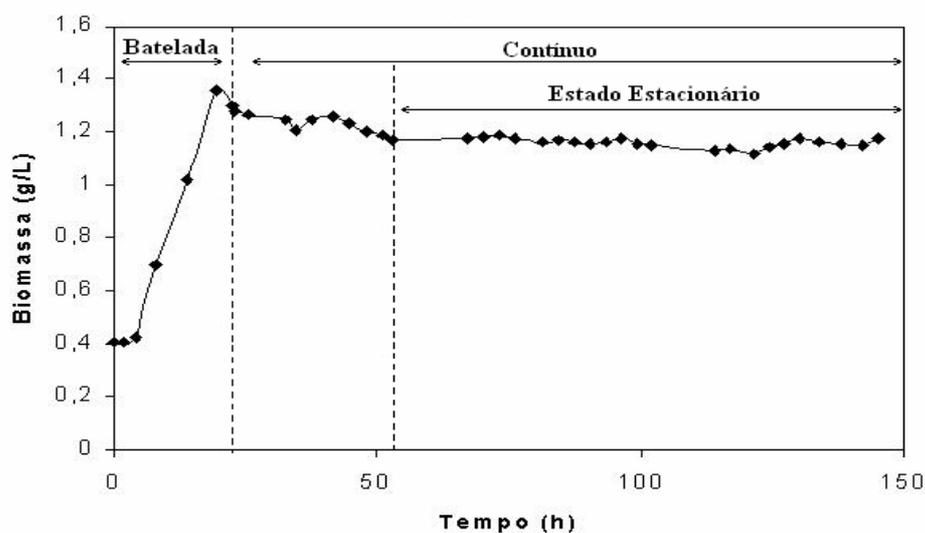


FIGURA 4.27: Fermentação 3 – Biomassa - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,07h^{-1}$ ).

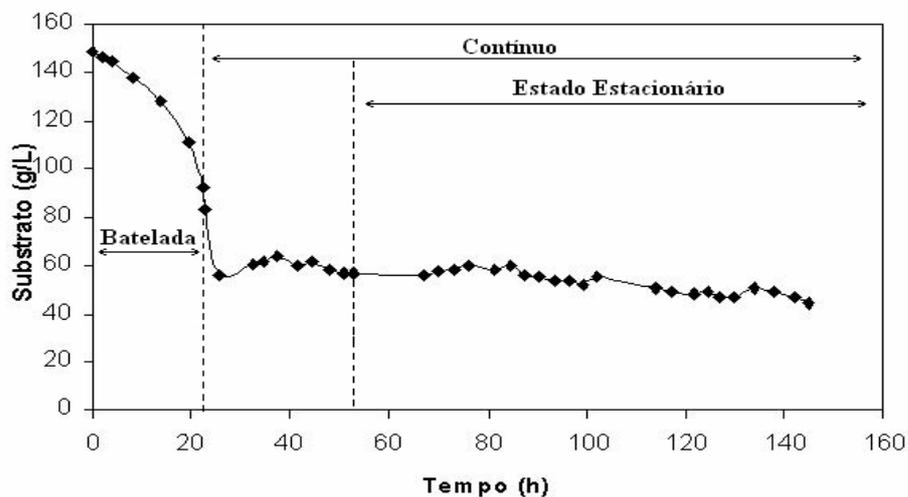


FIGURA 4.28: Fermentação 3 – Substrato – Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,07h^{-1}$ ).

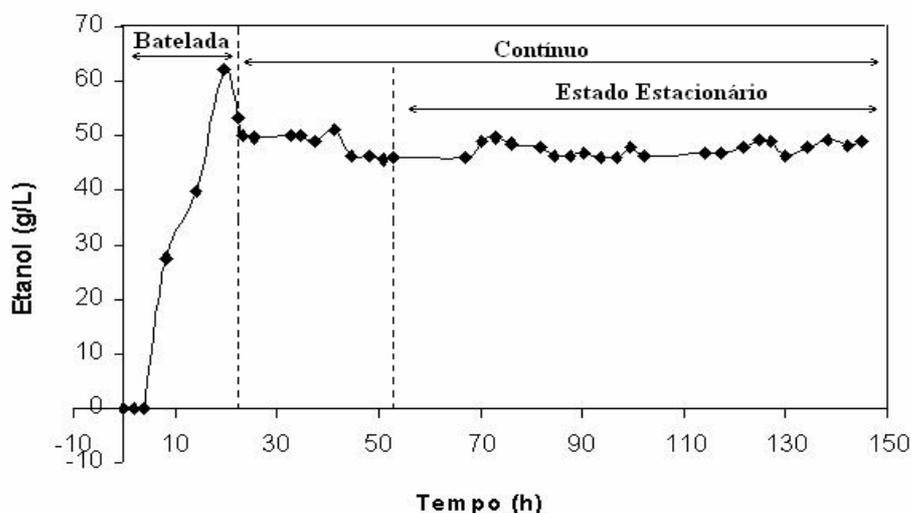


FIGURA 4.29: Fermentação 3 – Etanol - Fermentação em batelada seguida por contínuo ( $D = 0,07h^{-1}$ ).

As Figuras 4.30 a 4.32 apresentam os dados experimentais, obtidos nas Fermentações 1, 2 e 3 e os diagramas de bifurcação gerados na etapa computacional deste trabalho, utilizando os parâmetros da condição 3. As amplitudes máxima e mínima da curva oscilatória apresentam boa concordância com os ramos oscilatórios apresentados nos diagramas.

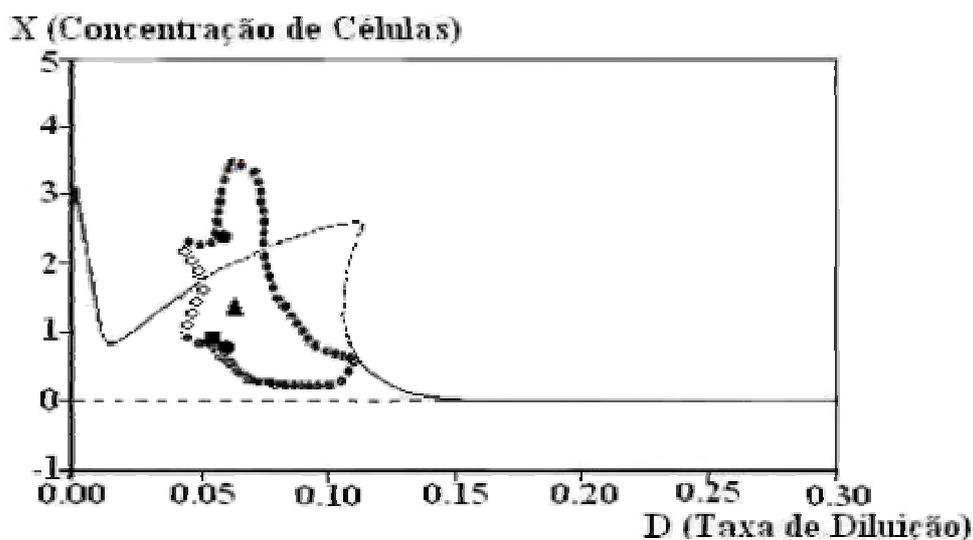


FIGURA 4.30: Diagrama de bifurcação da concentração de célula ( $X$ ) – Condição 3:  $M_{umax} = 0,41$ ,  $p_{ob} = 59$ ,  $p_{ma} = 217$ ,  $p_{mb} = 108$ ,  $p_{me} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{mp} = 0,2$ ,  $y_{ps} = 0,495$ ,  $S_F = 200$ ,  $a = 0,3142$ ,  $b = 1,415$ ,  $\alpha = 8,770$ ,  $\beta = 0,0366$ ,  $\lambda = 21,05$ ,  $\delta = 0,8241$ ,  $q_{pmax} = 2,613$  (LI 1995). (■) Dado experimental – Fermentação 1 -  $X = 0,8277$  g/L com  $D = 0,06$  h<sup>-1</sup>. (●) Dados experimentais – Fermentação 2 -  $X_{max} = 2,3799$  g/L e  $X_{min} = 0,7663$  g/L com  $D = 0,0675$  g/L. (▲) Dado experimental – Fermentação 3 -  $X = 1,180933$  g/L com  $D = 0,07$  h<sup>-1</sup>.

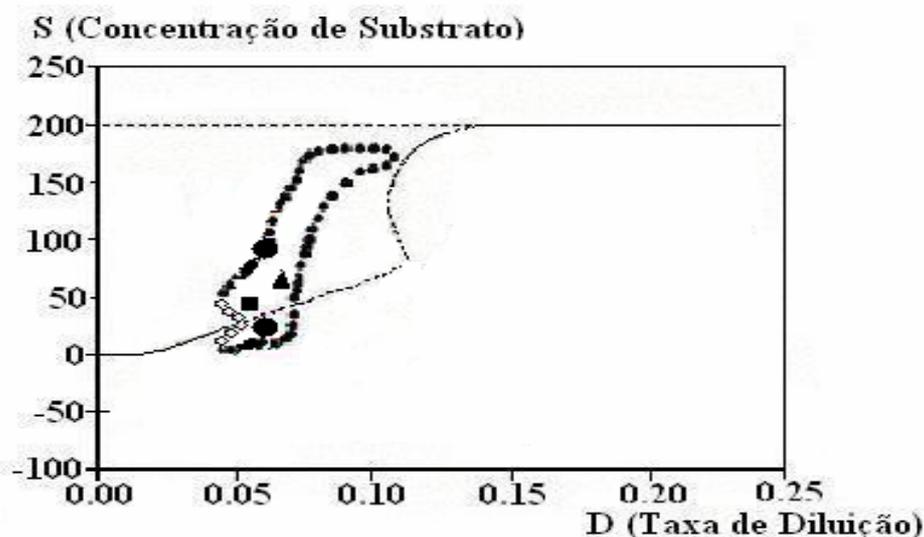


FIGURA 4.31: Diagrama de bifurcação da concentração de substrato (S) – Condição 3:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_F = 200$ ,  $a = 0,3142$ ,  $b = 1,415$ ,  $\alpha = 8,770$ ,  $\beta = 0,0366$ ,  $\lambda = 21,05$ ,  $\delta = 0,8241$ ,  $q_{\text{pmax}} = 2,613$  (LI 1995). (■) Dado experimental – Fermentação 1 -  $S = 41,03$  g/L com  $D = 0,06$  h<sup>-1</sup>. (●) Dados experimentais – Fermentação 2 -  $S_{\text{máx}} = 98,61$  g/L e  $S_{\text{mín}} = 24,26$  g/L com  $D = 0,0675$  g/L. (▲) Dado experimental – Fermentação 3 -  $S = 57,54$  g/L com  $D = 0,07$  h<sup>-1</sup>.

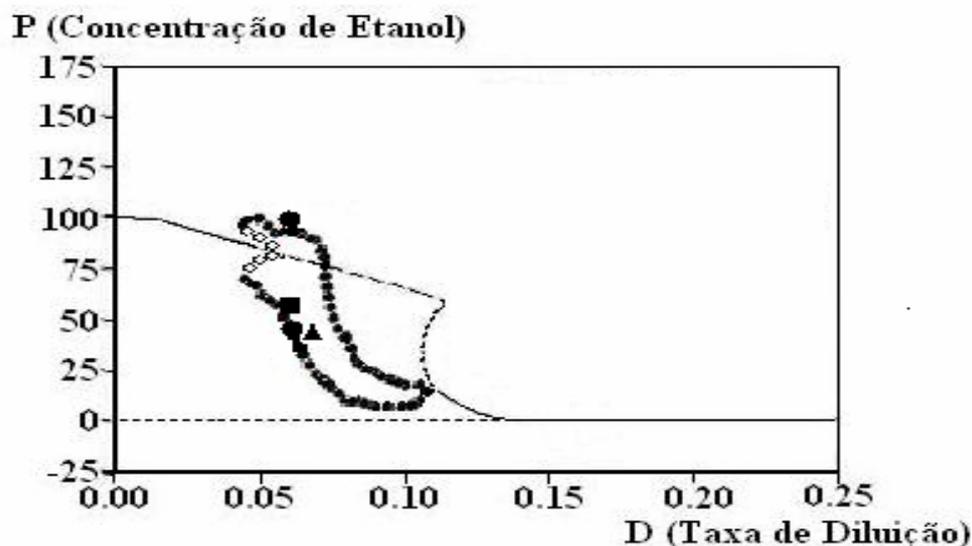


FIGURA 4.32: Diagrama de bifurcação da concentração de etanol (P) – Condição 3:  $M_{\text{umax}} = 0,41$ ,  $p_{\text{ob}} = 59$ ,  $p_{\text{ma}} = 217$ ,  $p_{\text{mb}} = 108$ ,  $p_{\text{me}} = 120$ ,  $s_i = 80$ ,  $k_i = 200$ ,  $k_s = 0,5$ ,  $k_{\text{mp}} = 0,2$ ,  $y_{\text{ps}} = 0,495$ ,  $S_F = 200$ ,  $a = 0,3142$ ,  $b = 1,415$ ,  $\alpha = 8,770$ ,  $\beta = 0,0366$ ,  $\lambda = 21,05$ ,  $\delta = 0,8241$ ,  $q_{\text{pmax}} = 2,613$  (LI 1995). (■) Dado experimental – Fermentação 1 -  $P = 51,2545$  g/L com  $D = 0,06$  h<sup>-1</sup>. (●) Dados experimentais – Fermentação 2 -  $P_{\text{máx}} = 98,7099$  g/L e  $P_{\text{mín}} = 50,3963$  g/L com  $D = 0,0675$  g/L. (▲) Dado experimental – Fermentação 3 -  $P = 48,9493$  g/L com  $D = 0,07$  h<sup>-1</sup>.

Os estados estacionários apresentam uma tendência de aumento de biomassa e diminuição de etanol no estado estacionário em função da taxa de diluição, porém os valores não apresentam boa concordância com os estados estacionários previstos pelo modelo. Isto pode ser justificado pelo fato de não terem sido realizadas estimações de parâmetros para a linhagem Ag11. A mudança dos parâmetros pode dar origem a diagramas bem diferentes, a depender dos novos valores das estimações. Pequenas modificações dos parâmetros podem levar a um estreitamento do trecho instável do diagrama de tal forma que todas as 3 condições estudadas estariam justificadas. A Fermentação 2 que atinge um estado estacionário e, devido a uma perturbação no sistema, foi levada à outra solução que é oscilatória. De forma semelhante ao diagrama de bifurcação gerado com os parâmetros da condição 3, o diagrama que representaria os comportamentos experimentais obtidos neste trabalho teria uma região com multiplicidade de estados estacionários, sendo um deles oscilatório. Os dados experimentais encontram-se no APÊNDICE 4.

# Capítulo 5

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES

### 5.1. Conclusões

Na primeira etapa deste trabalho, foi realizado um estudo dinâmico de fermentações contínuas com o microrganismo *Zymomonas mobilis* em meio complexo (LI 1995). Diagramas de Bifurcação foram construídos, uma vez que, através destes diagramas, foi possível identificar regiões dos parâmetros onde oscilação e multiplicidade ocorrem.

Os dados experimentais obtidos da literatura apresentaram boa concordância com os diagramas previstos, sejam eles estados estacionários ou oscilações amortecidas ou sustentadas. A construção dos diagramas de bifurcação teve sua importância, para a validação de modelos, ratificada ao prever oscilação amortecida para o comportamento dinâmico classificado como oscilação sustentada. Os diagramas de bifurcação foram construídos com os valores dos parâmetros a partir das estimações para fermentações com a bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29129.

A segunda etapa deste trabalho foi a confirmação experimental dos comportamentos dinâmicos previstos. Fermentações em batelada e contínuas foram realizadas utilizando-se *Zymomonas mobilis* Ag11. Através da fermentação em batelada a velocidade específica de crescimento foi determinada como sendo  $0,1166 \text{ h}^{-1}$ . Este valor é inferior as velocidades específicas de crescimento obtidos em outros trabalhos (VEERLAMALLU e AGRAWAL, 1990). As fermentações contínuas realizadas, totalizando três, tiveram taxas de diluições distintas,  $0,06 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,0675 \text{ h}^{-1}$  e  $0,07 \text{ h}^{-1}$ , e foram realizadas nas mesmas condições de operação da literatura (LI, 1995). Oscilações

sustentadas para biomassa, substrato e etanol foram observadas para taxa de diluição de  $0,0675 \text{ h}^{-1}$ . Nas demais fermentações, observaram-se estados estacionários. Os demais resultados experimentais, referentes às taxas de diluição de  $0,06$  e  $0,07 \text{ h}^{-1}$ , gerados neste trabalho, não apresentaram boa concordância com os diagramas de bifurcação gerados à partir do modo desenvolvido por LI (1995). As diferenças observadas podem ser justificadas pelo uso de uma linhagem diferente.

## 5.2. Sugestões para Trabalhos Posteriores

Sugere-se o estudo de uma faixa mais ampla de taxas de diluição para a confirmação do comportamento dinâmico previsto nos diagramas de bifurcação. Também sugere-se realizar estimações de parâmetros visando obter um conjunto de parâmetros que represente todos os comportamentos observados, desde estados estacionários a oscilações sustentadas.

Uma investigação do comportamento da *Zymomonas mobilis* Ag11, em algumas condições, em termos de pleomorfismo se faz necessário. É visto que durante a fermentação, o microrganismo sofre alteração na sua morfologia (LI, 1995), porém não houve acompanhamento deste aspecto durante este trabalho. Sugere-se assim uma investigação deste comportamento para *Z. mobilis* Ag11. E ainda sugere-se que um estudo da possibilidade de impedir o alongamento da bactéria através do suplemento de determinados nutrientes, pois esta investigação teria potencial considerável em fermentações industriais com *Z. mobilis*.

# Capítulo 6

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S. AND SHODA, M. – “Reassessment of the product Inhibition in Alcohol Fermentation”, *J. Ferment. Technol.*, **12**: 790-794, 1969.
- AGRAWAL, P.; LEE, C.; LIM, H. C. AND RAMKRISHNA, D. – “Theoretical Investigation of Dynamic Behavior of Isothermal Continuous Stirred tank Biological Reactors”, *Chemical Engineering Science*, **3**, **37**: 453-462, 1982.
- AMUNDSON, N. R. AND BILOUS, B. – “Chemical Reactor Stability and Sensitivity”, *A.I.Ch.E.* **1**: 513-521. 1955;
- AMUNDSON, N. R. AND ARIS, R. – “An Analysis of Chemical Reactos Stability and Control I: The Possibility of local control, with perfect or imperfect control mechanisms”, *Chemical Engineering Science*, **7**, 121-131, 1958a.
- AMUNDSON, N. R. AND ARIS, R. – “An Analysis of Chemical Reactos Stability and Control II: The Evolution of the Proportion Control”, *Chemical Engineering Science*, **7**, 132-147, 1958b
- AMUNDSON, N. R. AND ARIS, R. – “An Analysis of Chemical Reactos Stability and Control III: “The Principles of programming reactor calculations – some Extensions”, *Chemical Engineering Science*, **7**, 148-155, 1958c
- ANDREWS, J. F. – “A Mathematical model of the Continuous Culture of Microorganism Utilizing Inhibition Substrates”, *Biotechnology and Bioengineering*, **10**: 707-723, 1968.
- ARAUD, A. AND GUIRAUD, J. – “Bioquímica Microbiana. In: SCRIBAN, R. coord., *Biotechnologia*, São Paulo, manole, 1985, Cap. 2.
- BALAKOTAIAH, V. AND LUSS, D. – “Multiplicity Features of Reacting Systems – Dependence of the Steady-States of a CSTR on the residence time”, *Chem. Engng. Sci.*, **38**: 1709-1721, 1983.
- BARROW, K. D.; COLLINS, J. G.; ROGERS, R. L. AND SMITH, G. M. – “Lipid Compositions of an Ethanol-Tolerant Strain of *Zymomonas mobilis*”, *Biochimica et Biophysica Acta*, **753**: 324-330, 1983.

- BORZANI, W.; GREGORI, R. E. AND VAIRO, M. L. R. – “Some Observations on Oscillations Changes in the Growth Rate of *Saccharomyces cerevisiae* in Aerobic Continuous Undisturbed Culture”, *Biotechnology and Bioengineering*, **19**: 1363-1374, 1977.
- BRINGER, S.; HARTNER, T.; PORALLA, K. AND SAHM, H. – “Influence of Ethanol on the Hopanoid Content and the Fatty Acid Pattern in Batch and Continuous Cultures of *Zymomonas mobilis*”, *Archives of Microbiology*, **140**: 312-316, 1985.
- BRUCE, L. J.; AXFORD, D. B.; CISZEK, B. AND DAUGULIS, A.J. – “extractive Fermentation by *Zymomonas mobilis* and the Control of Oscillatory Behaviour”, *Biotechnol. Lett.*, **13**: 291-296, 1991.
- BUSCH, R. M.; SCOTT, C. D.; DAVISON, B. H. AND KLYND, L. R. – “Ethanol, the ultimate feedstock. A techno-economic evaluation of ethanol manufacture in fluidized bed bioreactors operating with immobilized cells”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **34/35**: 395-415, 1992.
- BURRILL, H.; DOELLE, H. W. AND GREENFIELD, P. F. – “The Inhibitory Effect of Ethanol on Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnology Letters*, **5**: 423-426, 1983.
- CAREY, V. C. AND INGRAM, L. O. – “Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: Effects of Ethanol and Glucose”, *Journal of Bacteriology*, **154**: 1291-1300, 1983.
- CHEN, CHING-I; McDONALD, K. A AND BISSON, L. – “Oscillatory Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in Continuous Culture: I. Effects of pH and Nitrogen Levels”, *Biotechnology and Bioengineering*, **36**: 19-27, 1990.
- CHEN, CHING-I; McDONALD, K. A AND BISSON, L. – “Oscillatory Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in Continuous Culture: II. Analysis of Cell Synchronization and Metabolism”, *Biotechnology and Bioengineering*, **36**: 28-38, 1990.
- CHI, C. T.; HOWELL, J. A. AND PAWLOWSK, U. – “Regions of Multiple Stable Steady States of a Biological Reactor With Wall Growth”, *Chemical Engineering Science* **29**: 207-211, 1974.
- CHI, C. T. AND HOWELL, J. A. – “Transient-Behavior of a Continuous Stirred Tank Biological Reactor Utilizing Phenol as an Inhibitory Substrate”, *Biotechnology and Bioengineering*, **18**: 63-80, 1976.
- DAUGULIS, A. J.; MCLELLAN, P. J. AND LI, J. H. – “Experimental Investigation and Modeling of Oscillatory Behavior in the Continuous Culture of *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnology and Bioengineering*, **56**: 99-105, 1997.

- DAWES, E. A.; RIBBONS, D. W. AND LARGE, P. J. – “The route of Ethanol Formation in *Zymomonas mobilis*”, *Biochem. J.*, **98**: 795-803, 1966(a).
- DOEDEL, E.; CHAMPNEYS, A. R.; FAIRGRIEVE, T. F.; KUZNETSOV, Y. A.; SANDSTEDE, B. AND WANG, X. – “AUTO97: Continuation and Bifurcation Software for Ordinary Differential Equations”, User’s Guide, Montreal, Concordia University, 1997.
- DOELLE, H. W. AND GREENFIELD, P. F. – “The Production of Ethanol from Sucrose Using *Zymomonas mobilis*”, *Applied Microbiology Biotechnology*, **22**: 405-410, 1985.
- EDWARDS, V. H. – “The Influence of High Substrate Concentrations on Microbiol Kinetics”, *Biotechnology and Bioengineering*, **12**: 679-712, 1970.
- EVELEIGH, D. E.; STOKES, H. W. AND DOLLY, E.L. – “recombinant DNA approaches fro Enhancing the Ethanol Productivity of *Zymomonas mobilis*”; in “Organic Chemicals from Biomass”; Edited. By D. L. Wise; The Benjamin/Cummings publishing Company, Inc, menloPark-USA; 1983.
- FALCÃO DE MORAIS, J. O. – “*Zymomonas mobilis* e o seu emprego como agente de fermentação alcoólica”, *Revista do Instituto de Antibióticos*, **1**:169-182, 1982.
- FARR, W. W. AND ARIS, R. – “Yet Who Would Have Thought the Old Man to Have Had so Much Blood in Him?” – Reflections on the Multiplicity of Steady States of the Stirred tank Reactor”, *Chem. Engng. Sci.*, **41**:1385-1402, 1986.
- FERRARA, N. F. AND PRADO, C. P. C. – CAOS: Uma Introdução, Ed. Edgard Blücher Ltda. São Paulo, 1995.
- FINN, R. K. AND WILSON, R. E. – “Fermentation Process Control – populations Dynamics of a Continuous Propagator for Microorganism”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2**:66-69, 1954.
- FRANÇA, F. P. AND RODRIGUES, M. C. S. – “Fermentação Alcoólica Desenvolvida por *Zymomonas mobilis* CP3”, *Rev. Lat. Amer. Microbiol*, **27**: 55-60, 1985.;
- FREITAS FILHO, I. P.; BISCAIA JR., E. C. AND PINTO, J. C. – “Steady-State Multiplicity in Continuous Bulk Polymerization Reaction – a general approach”, *Chem. Engng. Sci.*, **49**: 3745-3755, 1994.
- GALAJ, M.; PIETRZYKOWSKA, M. AND WLODARCZYK, Z. – “Preliminary Comparison of Some Substrates Ethanol Fermentation Using *Zymomonas mobilis* Bacteria and Industrial Yeasts”, *Przem. Ferm. Owoc. Warzyw.*, **9**: 13-15, 1994.

- GALANI, I.; DRAINAS, C. AND TYPAS, M. A. – “Growth Requirements and the Establishment of a Chemically defined Minimal, Medium in *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnol. Lett.*, **7**, **9**: 673-678, 1985.
- GILLEY, J. W. AND BUNGAY, H. R. – “Oscillatory Growth Rate Responses of *S. cerevisiae* in Continuous Culture”, *Biotechnology and Bioengineering*, **9**: 617, 1967.
- GHOMMIDH, C; VAIJA, J.; BOLARINWA, S. AND NAVARRO, J. M. – “Oscillatory Behaviour of *Zymomonas*5 in Continuous Cultures: A simple Stochastic Model”, *Biotechnol. Lett.*, **11**: 659-664, 1989.
- GHOSE, T. K AND TYAPI, R. D. – “Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate, II. Product and Substrate Inhibition and Optimization of Fermenter Design”, *Biotechnology and Bioengineering*, **21**: 1401-1420, 1979.
- GUCKENHEIMER, J. AND HOLMES, P. – “Nonlinear Oscillations, dynamical systems and Bifurcation of Vector fields”, Springer-Verlag: New York, Heidelberg e Berlin. 1983.
- IMANAKA, T.; KAIEDA, T.; SUTO, K. AND TAGUCHI, H. – “Optimization of  $\alpha$ -Galactosidase Production in Mold”, *Journal of Fermentation Technology*, **50**: 633. (apud BUTTKE et. al., 1981), 1972.
- IMANAKA, T.; KAIEDA, T. AND TAGUCHI, H. – “Unsteady State Analysis of a Kinetic Model for Cell Growth and of  $\alpha$ -Galactosidase Production in Mold”, *ibid.*, **51**: 423, 1973.
- INGRAM, L. O. AND BUTTKE, T. M. – “Effect of Alcohols on Microorganisms”, *Advances in Microbial Physiology*(Academic Press), **25**:253-300, 1984.
- JARZEBSKI, A. B. – “Modelling of Oscillatory Behaviour in Continuous Ethanol Fermentation”. *Biotechnol. Lett.* **14**: 137-142, 1992
- JÖBSES, I. M. L.; EGBERTS, G. T. C.; VAN BAALEN, A. and ROELS, J. A. – “Mathematical Modelling of growth and Substrate Conversion of *Zymomonas mobilis* at 30 and 35°C”, *Biotechnol. Lett.*, **27**: 984-995, 1985.
- JÖBSES, I. M. L.; EGBERTS, G. T. C.; LUYBEN, K. C. A. M and ROELS, J. A. – “Fermentation Kinetics of *Zymomonas mobilis* at High Ethanol Concentration: Oscillations in Continuous Cultures”, *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 868-877, 1986.
- LAWFORD, H. G. – “A New Approach to Improving the Performance of *Zymomonas* in Continuous Ethanol Fermentation”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **17**: 203-209, 1988.

- LEE, K. L.; SKOTNICKI, M.L.; TRIBE, D. E. AND ROGERS, P. L. – “Kinetic Studies on a highly Productive Strain of *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnol. Lett.*, **2**: 339-344, 1980.
- LEE, K. L. e ROGERS, P. L. – “The Fermentation Kinetics of Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*”, *Chem. Eng. J.*, **27**: 31-38, 1983.
- LENBURY, Y.; NOVAPRATEEP, B. AND WIWATPATAPHEE, B. – “Dynamic Behavior Classification of a Model for a Continuous Bio-Reactor Subject to Product Inhibition”, *Mathematical and Computer Modelling*, **19**,12: 107-117, 1994.
- LENBURY, Y. AND CHIARANAI, C. – “Bifurcation Analysis of a Product Inhibition Model of Continuous Fermentation Process”, *Applied Microbiology Biotechnology*, **25**: 532-534, 1987.
- LI, J. – “Experimental Investigation and Mathematic Modelling of oscillatory Behaviour in the Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis*”, Kingston, Ontário, Canadá, 1995 (Tese de Doutorado, Queen’s University).
- LI, J., MCLELLAN, P. K.L. AND DAUGULIS, A. J. – “Inhibition Effects Ethanol Concentration History and Ethanol Concentration Change Rate on *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnology Letters*, **17**,3: 321-326, 1995.
- LILJENROTH, F. G. – “Starting and Stability Phenomena of Ammonia-Oxidation and Similar reactions”, *Chemical Metallurgical Engineering*, **19**: 287, 1918.
- LOUNG, J. H. – “Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation”, *Biotechnology and Bioengineering*, **25**: 280-285, 1985.
- MCLELLAN, P. J.; DAUGULIS, A.J. AND LI, J. – “The Incidence of Oscillatory Behaviour in the Continuous Fermentation of *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnology Progress*, **15**: 667-680,1999.
- MAGALHÃES, A. P. – Levana como co-produto da fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis*; Rio de Janeiro-RJ, 1989 (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- MAXON, W. D. – “Continuous Fermentation”, *Industrial and Engineering Chemistry*, **1**, **52**: 64-65, 1960.
- MCGILL, D. J. AND DAWES, E. A. – “Glucose and fructose metabolism in *Zymomonas anaerobia*, *Biochem. J.*, **125**: 1059-1068, 1971.
- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, New York, **3**: 371-394, 1949

- MORAIS, J. O. F. – “*Zymomonas mobilis* e seu possível emprego como agente de Fermentação Alcoólica” *Ver. Inst. Antibiot.*, 1-2, **2**: 169-182, 1982.
- MORAIS, J. O. F.; ARAÚJO, J. M.; RIOS, E. M.; MELLO, B. R. – “Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentação alcoólicas industriais”, *Rev. Microbiol.*; **14**(1): 6-10, 1983
- NOWAK, J. – “Genetic Modification of Microorganisms for Ethanol Production from Hemicelluloses”, *Biotechnology*, **3**: 89-97, 1998.
- OSMAN, Y. A. AND INGRAM, L. O. – “Mechanism of Ethanol Inhibition of Fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4”, *Journal Bacteriology*, **164**: 173-180 1985.
- PAWLOWSKY, U AND HOWELL, J. A. – “Mixed Culture Biooxidation of Phenol. I. Determination of Kinetic Parameters”, *Biotechnology and Bioengineering*, **15**: 889-896, 1973.
- PALHA, M. A. P. F. – Emprego do Método Simplex no Estudo Cinético da fermentação Alcoólica Contínua por *Zymomonas mobilis*; Recife-PE, 1987 (Dissertação de Mestrado, CCB/Universidade Federal de Pernambuco).
- PINHEIRO, I. O. – Fermentação de *Zymomonas mobilis* em meio Mínimo com Asparagina como Fonte de Nitrogênio; Rio de Janeiro-RJ, 2001 (Tese de Doutorado, PEQ/COPPE/Universidade Federal de Rio de Janeiro).
- PORRO, D.; MARTEGANI, E.; RANZI, B. M. AND AKLBERGHINA, L. – “Oscillations in Continuous Cultures of Budding Yeast: A Segregated Parameter Analysis”, *Biotechnology and Bioengineering*, **32**: 411-417, 1988.
- RAMKRISHNA, D.; FREDRICKSON, A. G. AND TSUCHIYA, H. M. – “Dynamics of Microbial Propagation: Models Considering Inhibitors and Variable Cell Composition”, *Biotechnology and Bioengineering*, **9**: 129-170, 1967.
- REGAN, D. L.; SCHIMITZ, R. A. AND MOSS, J. F. – “Response of Continuous Cultures to Stimuli in Glucose Feed and Dilution Rate”, *Biotechnology and Bioengineering*, **13**: 815-824, 1971.
- RIOS, E. M.; CALAZANS, G. M. T.; ANTUNES, R. V.; ACCIDY, L. G. A. OTAMAR, J. AND MORAIS, F. – “Glucose Fermentation by *Zymomonas mobilis* – Effect of Addition of Ethanol and of Cell Free Fermented Must on the Microbial Growth and Ethanol Production”, *Arg. Biol. Techno.*, **34**: 45-52, 1991.
- ROGERS, P. L.; LEE, K. J. AND TRIBE, D. E. – “High Productivity Ethanol Fermentations with *Zymomonas mobilis*”, *-Process biochemistry*, 37-84, 1980.

- ROGERS, P. L.; LEE, K. J., SKOTNICKI, M. L. AND TRIBE, D. E. – “Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*”, *Advances in Biochemical Engineering*, **23**: 37-84, 1982.
- ROGERS, P.L.; STRZELECKI, A. T. AND GOODMAN, A. E. – “Commercial Potential of *Zymomonas* process for Ethanol Production”, *Found. Biotechnol. Industrial. Ferm. Res.*, **4**: 63-79, 1986.
- ROGERS, P. L.; LEE. K. J.; SMITH, G. M. AND BARROW, K. D. – “Ethanol Tolerance of *Zymomonas mobilis*”, *Alcohol Toxicity in Yeasts and Bacteria*, van Uden Ed. (CRC Press, Boca Raton, FL.), 239-256, 1988.
- STOKES, H. W.; DALLY, E.; SPANIEL, D. T.; WILLIAMS, R. L. MONTENECOURT, B. S. AND EVELEIGH, D. E. – “*Zymomonas*: The phantom Ethanol Producer. *Biosources Digest*, **3**: 124-132, 1981.
- SWINGS, J.; DELEY, J. – “The Biology of *Zymomonas*”, *Bacteriological Reviews*, **41**,1:1-46, 1977.
- SWINGS, J.; DELEY, J. – “Genus *Zymomonas* Kluuyver and vanNiel 1936, 399” in “Bergey’s Manual os Systematic Bacteriology”; edited by N. R. Krieg; Williams & Wilkiens, Baltimore-USA; 1<sup>st</sup> edition, vol **1**, 1984
- UPPAL, A.; RAY, W. H. AND POORE, A. B. – “On the Dynamic Behavior of Continuous Stirred Tank Reactor”, *Chemical. Engineering Science*, **29**: 967, 1974.
- UPPAL, A.; RAY, W. H. AND POORE, A. B. – “The Classification of the Dynamic Behavior of Continuous stirred tank reactors – Influence of reactor residence time”, *Chem. Engng. Sci.*, **31**: 205-214, 1976.
- VAN HEERDEN, C. – “Autothermic Process”, *Ind. Engng. Chem.*, **44**: 1242, 1953.
- VEERAMALLU, U. AND AGRAWAL, P. – “A Structured Kinetic Model for *Zymomonas mobilis* ATCC10988”, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**: 649-704, 1990.
- XIU, Z.; ZENG, A. AND DECKWER, W. – “Multiplicity and Stability Analysis of Microorganisms in Continuous Culture: Effects of Metabolic Overflow and Growth Inhibition”, *Biotechnology and Bioengineering*, **3**, **57**: 251-261, 1998.

# Apêndices

**APÊNDICE 1****CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE*****Zymomonas mobilis* Ag11**

A curva de calibração foi obtida através das leituras, em espectrofotômetro (Hewlett Packart 8453, em 600 nm), das diluições de um concentrado bacteriano inicial. Este concentrado foi obtido através da centrifugação do meio de crescimento após o término da fermentação. Aproximadamente a metade do sobrenadante foi descartada e o precipitado foi resuspenso. Deste concentrado bacteriano, retiraram-se três alíquotas de 10 mL para 3 tubos de ensaio previamente pesados e que foram centrifugados novamente.

O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi resuspenso com água destilada para nova centrifugação. Este processo foi repetido por três vezes. O objetivo da adição de água destilada é retirar resíduos do meio que possam ter sido arrastados com pó precipitado, de forma que o peso seco corresponda somente às células de *Zymomonas mobilis*. Posteriormente o sobrenadante foi retirado e os três tubos foram levados à estufa, a 100°C, até peso constante. Com isso, obteve-se a concentração do concentrado bacteriano inicial. Os resultados obtidos nos três tubos foram os seguintes:

<b>TUBOS</b>	<b>MASSA(g)</b>
1	0,0475
2	0,0461
3	0,0449
VALOR MÉDIO	0,0462 g
CONCENTRAÇÃO	4,617 g/L

As diluições, para leitura em espectrofotômetro, foram obtidas pela diluição do concentrado bacteriano inicial com água destilada. Sabendo-se a concentração inicial

e as diluições realizadas, foi possível construir uma curva de calibração de concentrações contra absorbância para *Zymomonas mobilis* Ag11 (Figura A1-1).

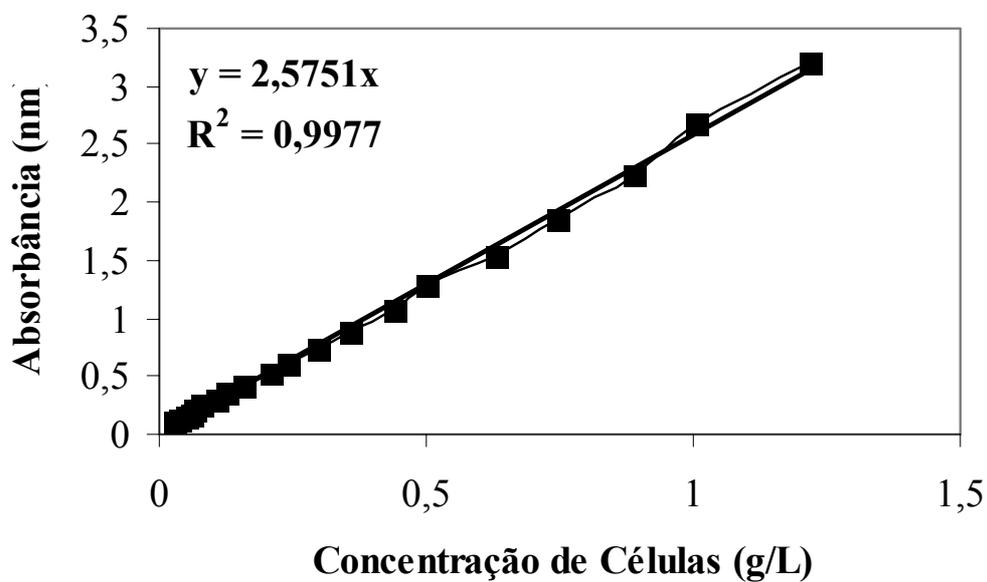


Figura AI-1: Curva de calibração para a *Zymomonas mobilis* Ag11.

## APÊNDICE 2

### INSTALAÇÃO DO AUTO97 NO LINUX RED HAT

O procedimento que será apresentado, explica as etapas de instalação do software OpenSource AUTO97 no Sistema Operacional Linux da distribuição Red Hat. Este procedimento poderá ser adaptado para outras distribuições como Conectiva. Inicialmente, faz-se necessário verificar se o Linux a ser utilizado possui o Fortran instalado. Para isso, deve-se digitar, como root, “g77” no ambiente de prompt de comando. Caso o Fortran esteja instalado recebe-se uma saída parecida com:

```
[carolina@deepblue carolina]$ g77  
g77: no input files
```

Caso não esteja instalado, a resposta é:

```
[carolina@deepblue carolina]$ g77  
bash: g77: command not found
```

Neste caso, deve-se instalar o Fortran. Para isso, deve-se ir para o diretório do CD de instalação do Sistema Operacional Linux Red Hat no qual está armazenado o Fortran usando os seguintes comandos (executados como usuário “root”):

```
# mount /mnt/cdrom# cd /mnt/cdrom/redhat/RPMS (entrar no CD)  
# rpm -i gcc-g77-3.2.2-5 gcc-3.2.2-5 (comando para instalar o Fortran)
```

Dependendo da distribuição em uso, os pacotes a serem instalados podem variar a versão e o nome, mas será sempre algum pacote referente a “g77”. Feito este procedimento, basta ir para o endereço <http://indy.cs.concordia.ca/auto/main.html> para baixar o programa AUTO97. Os arquivos necessários para a instalação podem ser baixados diretamente do servidor FTP <ftp://ftp.cs.concordia.ca/pub/doedel/auto/>. São eles:

<code>auto.ps.gz</code>	506 KB	21-09-2001	00:00:00
<code>auto.tar.gz</code>	1052 KB	21-09-2001	00:00:00

No diretório para o qual foram baixados os arquivos, utilizar os seguintes comandos para descompactar os arquivos:

```
$ gunzip auto.ps.gz
$ tar xzf auto.tar.gz
```

Logo em seguida, aparecerá um diretório chamado “auto” e um arquivo postscript “auto.ps”. Basta mover o diretório auto para um lugar desejado, como seu diretório “home”, utilizando o comando:

```
$ mv auto /home/ACRC/auto
```

O próximo passo é fazer a configuração do arquivo “.bash\_profile” que está no diretório home do usuário. Este é um arquivo oculto, como todos aqueles iniciados com um ponto. No Gedit (editor de arquivo texto), por exemplo, deve-se adicionar, antes da linha do PATH, a variável de ambiente do auto com a sua localização, conforme abaixo:

```
AUTO_DIR=$HOME/auto/97
```

e adicionar ao final da linha do PATH :

```
:$AUTO_DIR:$AUTO_DIR/bin: $AUTO_DIR/cmds:./.
```

Em seguida adicionar à linha do export, nome da variável do auto: AUTO\_DIR. O arquivo modificado se apresenta conforme a Tabela A1.1 abaixo:

TABELA A1.1: Modificação do arquivo “.bash\_profile”

ANTES	DEPOIS
>PATH=\$PATH:\$HOME/bin	>PATH=\$PATH:\$HOME/bin:\$AUTO_DIR:\$AUTO_DIR/bin:\$AUTO_DIR/cmds:./.
> export USERNAME BASH_ENV PATH	> export USERNAME BASH_ENV PATH AUTO_DIR

Para que as alterações tenham efeito é necessário simplesmente fechar a sessão e logar-se outra vez no sistema. Antes de compilar, é necessário entrar no diretório do auto e no diretório do tek2ps e editar o arquivo tek2ps.c, para isso basta definir a variável def\_pro, assim:

```
> static char def_pro[]="/home/anna/auto/97/tek2ps/pstek.pro"
```

Por fim, basta agora compilar o programa. Para isto, deve-se entrar no diretório do auto e digitar make cmd. Após a compilação do programa, deve-se testá-lo executando um exemplo. Caso isso não ocorra, rever todos os passos anteriores.

Para o funcionamento do programa basta abrir os dois arquivos anna.f e r.anna, por exemplo, onde o primeiro informa o modelo e um estado estacionário como condição inicial um estado estacionário como condição inicial e o outro é onde os parâmetros necessários para gerar o diagrama são colocados.

Uma vez feita as modificações necessárias, basta abrir o konsole e usar os comandos básicos, @r e @p para o funcionamento do AUTO, ou seja, basta digitar no konsole:

@r anna (para compilar o arquivo "anna.f" gerando "anna.o" que é executado logo em seguida) e

@p (para gerar o diagrama de bifurcação da última compilação/execução correta)

## APÊNDICE 3

## AUTO97 - SUBROTINA PARTICULAR PARA UTILIZAÇÃO DO AUTO

```

C-----
C-----
C   MESTRADO   2002/2004 ANNA CAROLINA - ESTUDO DO MODELO
DE LI
C-----
C-----
C
      SUBROUTINE FUNC (NDIM, U ,ICP  PAR, IJAC, F, DFDU,
      DFDP )
C   -----
C
C Evaluates the algebraic equations or ODE right hand side
C
C Input arguments   :
C   NDIM :      Dimension of the ODE system
C   U    :      State variables
C   ICP  :      Array indicating the free parameter (s)
C   PAR  :      Equation parameters
C
C Values to be returned   :
C   F    :      ODE right hand side values
C Normally 7 unused jacobian arguments: IJAC, DFDU, DFDP
(see manual)
C
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H, O-Z )
      DIMENSION U (NDIM), PAR(*), F(NDIM), ICP(*)
      DOUBLE PRECISION Um, Mumax, Mul

      Common mumax, pob, pma, pmb, pme, si, zki, zks, zkmp,
      yps, common sf, qpmax, a , alfa, b, beta, zlambda,
      zdelta

c   Write (*,*) 'in func'
c   Write (*,*) 'ndim = ', ndim
c   Write (*,*) Mumax
c   Write (*,*) Pob
c   Write (*,*) Pma
c   Write (*,*) Pmb
c   Write (*,*) Pme
c   Write (*,*) Si
c   Write (*,*) zki
c   Write (*,*) zks
c   Write (*,*) zkmp
c   Write (*,*) Yps
c   Write (*,*) Sf

```

```

c      Write (*,*) Qpmax
c      Write (*,*) a
c      Write (*,*) alfa
c      Write (*,*) b
c      Write (*,*) beta
c      Write (*,*) zlambda
c      Write (*,*) zdelta
c      Read (*,*)

C*****
      VETOR DAS DERIVADAS YPRIME DO SISTEMA
C*****

      d=par(1)

      cond1=U (2)-Si
      cond2=(U(3)-pob) / (Pmb-Pob)

      IF (U(3) .LE.Pob) THEN
      COND2=0.
      END IF

      IF (U(3) .GT.Pmb) THEN
      Cond2=1.
      END IF

      IF (U(2) .LE.Si) THEN
      Cond1=0.
      END IF

      F1=dexp (zlambda*U(4)-zdelta)
      F2=dexp (-zlambda*U(4)+zdelta)
      Fmu=(1./2.)*(1.-((f1-f2)/(f1+f2)))

      Mul=Mumax*U(2)*((1.-(U(3)/Pma)**a)*(1.-|(cond2)**b))
      *      / (zKs+U(2)+U(2)*(cond1)/(zKi-Si))
      Mu=Fmu*Mul
      Qp=qpmax*U(2)/(zKmp+U(2))*(1.-(U(3)/Pme)**alfa)

      F(1)=(Mu-d)*U(1)
      F(2)=d*(sf-U(2))-Qp*U(1)/Yps
      F(3)=Qp*U(1)-d*U(3)
      F(4)=beta*(U(5)-U(4))
      F(5)=beta*(Qp*U(1)-d*U(3)-U(5))

      RETURN
      END

C-----
C-----
C
      SUBROUTINE STPNT (NDIM,U,PAR)

```

```

C -----
C
C Input arguments :
C   NDIM :   Dimension of the ODE system
C
C Values to be returned :
C   U    :   A starting solution vector
C   PAR  :   The corresponding equation-parameter values
C
C   IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H, O-Z )
C   DIMENSION U (NDIM), PAR(*)
C   DOUBLE PRECISION Um, Mumax, Mul
C
C   Common mumax, pob, pma, pmb, pme, si, zki, zks, zkmp,
C   yps, common sf, qpmax, a , alfa, b, beta, zlambda,
C   zdelta
C
C   Mumax=0.41
C   Pob=59.
C   Pma=217.
C   Pmb=108.
C   Pme=120.
C   Si=80.
C   ZKi=200.
C   ZKs=0.5
C   ZKmp=0.2
C   Yps=0.495
C   Sf=150.
C
C   FERMENTACAO CONDICAO 01
C   Qpmax=4.2
C   a=0.6216
C   alfa=2.6
C   b=0.5516
C   beta=0.0767
C   zlambda=3.8
C   zdelta=7.8
C
C   Write (*,*) 'in func'
C   Write (*,*) 'ndim = ',ndim
C   Write (*,*) 'Mumax=',Mumax
C   Write (*,*) 'Pob=',Pob
C   Write (*,*) 'Pma=',Pma
C   Write (*,*) 'Pmb=',Pmb
C   Write (*,*) 'Pme=',Pme
C   Write (*,*) 'Si=',Si
C   Write (*,*) 'zki=',zki
C   Write (*,*) 'zks=',zks
C   Write (*,*) 'zkmp=',zkmp
C   Write (*,*) 'Yps=',Yps

```

```
Write (*,*) 'Sf=',Sf
Write (*,*) 'Qpmax=',Qpmax
Write (*,*) 'a=',a
Write (*,*) 'alfa=',alfa
Write (*,*) 'b=',b
Write (*,*) 'beta=',beta
Write (*,*) 'zlambda=',zlambda
Write (*,*) 'zdelta=',zdelta
Pause
```

C Initialize the equation parameters

```
PAR(1)=.02
```

C Initialize the solution

```
U(1)=.000
U(2)=150.
U(3)=.0000
U(4)=.0000
U(5)=.0000
```

```
RETURN
END
```

C-----  
C-----

C The following subroutines are not used here,  
C but they must be supplied as dummy routines

C

```
SUBROUTINE BCND
RETURN
END
```

C

```
SUBROUTINE ICND
RETURN
END
```

C

```
SUBROUTINE FOPT
RETURN
END
```

C

```
SUBROUTINE PVLS
RETURN
END
```

C-----  
C-----

## APÊNDICE 4

DADOS EXPERIMENTAIS DAS FERMENTAÇÕES CONTÍNUAS COM DIFERENTES TAXAS DE DILUIÇÃO

**Taxa de Diluição:  $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$**

Tempo (h)	Biomssa (g/L)	Substrato (g/L)	Etanol (g/L)	Tempo (h)	Biomssa (g/L)	Substrato (g/L)	Etanol (g/L)
0	0,41	148,34	0	76,16	1,17	59,72	48,64
2	0,41	146,16	0,06	81,5	1,16	58,48	47,74
4	0,42	144,20	0,08	84,5	1,16	59,75	46,53
8	0,70	137,51	27,52	87,5	1,16	55,80	46,49
14	1,02	128,09	39,76	90,5	1,15	55,39	46,74
19,5	1,35	110,77	62,40	93,5	1,16	53,76	46,03
22,5	1,30	92,18	53,29	96,5	1,17	53,47	46,01
23	1,28	83,33	50,07	99,5	1,15	51,91	47,72
25,5	1,26	56,11	49,85	102,16	1,15	54,88	46,51
32,5	1,24	60,81	50,23	114,16	1,13	50,46	46,67
34,5	1,21	61,27	50,10	117,16	1,13	48,67	46,77
37,5	1,25	63,52	48,97	121,58	1,12	48,43	47,86
41,5	1,26	59,60	51,32	124,58	1,14	49,07	49,53
44,5	1,24	61,26	46,40	127	1,15	46,63	48,96
48	1,20	58,38	46,46	130	1,17	46,85	46,53
51	1,19	56,53	45,75	134	1,16	50,44	48,05
53	1,17	56,90	46,08	138	1,15	48,58	49,44
67,16	1,17	55,61	46,05	142	1,15	46,25	48,38
70,16	1,18	57,54	48,95	145	1,17	44,11	49,06
73,16	1,19	58,42	49,82				

**Taxa de Diluição:  $D = 0,0675 \text{ h}^{-1}$** 

Tempo (h)	Biomssa (g/L)	Substrato (g/L)	Etanol (g/L)	Tempo (h)	Biomssa (g/L)	Substrato (g/L)	Etanol (g/L)
0	0,06	156,59	0	111	1,10	63,13	50,92
4	0,08	154,41	0,11	114	1,04	58,71	46,12
8	0,10	152,45	0,13	117	1,22	56,92	56,77
12	0,13	145,76	4,17	120	1,22	56,68	57,86
16	0,22	124,23	9,59	123	1,24	57,32	59,53
21,42	0,37	119,02	17,46	126	1,25	54,88	58,96
24	0,45	100,43	22,64	129	1,23	55,10	56,53
27,42	0,62	91,58	38,12	132	1,19	58,69	55,73
32,11	0,95	64,36	50,36	144	1,54	47,55	62,67
35,75	1,27	69,06	70,89	147	1,48	54,50	58,38
40	1,30	69,52	52,72	150	1,91	40,26	69,61
44	1,25	71,77	58,97	155,26	2,13	32,35	81,91
48	1,31	67,85	63,43	160,5	2,38	24,26	98,71
52	1,33	69,51	55,35	170	2,31	24,97	93,18
58	1,35	66,63	56,46	172,26	2,15	29,10	82,76
60	1,24	64,78	55,75	176	1,44	32,57	60,88
72	1,28	65,15	56,08	179	0,99	58,85	54,49
75	1,28	63,86	52,88	182	0,94	65,42	53,58
77	1,35	65,79	63,17	185	0,88	91,76	52,60
81,26	1,25	66,67	59,82	188	0,77	98,61	50,40
84	1,34	67,97	52,31	191	0,84	89,83	51,58
88	1,18	66,73	57,74	195,5	0,99	64,04	57,32
92	1,18	68,00	52,31	200	1,38	46,55	64,19
95	1,10	64,05	51,21	205	1,74	28,02	79,67
98	1,13	63,64	50,42	214	2,39	25,27	98,29
101,5	1,10	62,01	50,75	219	2,42	24,09	99,99
104	1,05	61,72	43,34	225	2,24	39,93	88,41
108	1,10	60,16	52,45	238	1,31	73,44	66,62

**Taxa de Diluição:  $D = 0,07 \text{ h}^{-1}$** 

Tempo (h)	Biomssa (g/L)	Substrato (g/L)	Etanol (g/L)	Tempo (h)	Biomssa (g/L)	Substrato (g/L)	Etanol (g/L)
0	0,04	143,85	0	74	0,83	41,03	51,25
2,26	0,06	142,1	0,11	77	0,81	38,21	51,21
5	0,12	141,89	0,12	80	0,78	39,55	50,42
8	0,19	138,25	4,17	83	0,77	40,97	50,75
11	0,34	128,46	9,59	86	0,74	41,88	43,34
14	0,56	112,03	17,46	89	0,75	42,1	48,23
17	0,73	89,23	22,64	92	0,76	44,19	47,75
20,16	0,80	80,21	38,12	95	0,76	42,32	46,11
23,16	0,97	50,46	50,36	99	0,76	41,99	46,23
26,16	1,14	58,19	60,34	101	0,77	41,03	47,21
29,16	1,04	59,58	52,72	104	0,75	42,1	49,73
32,16	1,07	48,25	57,91	112	0,75	40,54	47,25
35	1,02	45,1	54,99	115	0,74	41,27	49,15
38	0,90	46,51	43,74	118	0,75	40,17	51,62
41	0,87	44,31	45,92	121	0,76	39,98	50,01
44	0,89	41,58	45,41	124	0,75	39,42	48,88
47	0,84	42,69	45,53	137	0,78	38,25	48,63
50	0,84	40,95	42,33	139	0,77	36,94	50,26
53	0,83	39,25	50,51	144	0,76	37,45	45,96
65	0,81	39,75	50,33	147	0,77	38,79	50,98
68,33	0,80	40,01	52,31	151	0,76	36,25	51,11
71	0,80	39,98	46,14				

# Anexos

**ANEXO 1****DADOS EXPERIMENTAIS DA CONDIÇÃO 1 (LI, 1995)**

Taxa de Diluição (D h <sup>-1</sup> )	Biomassa (g/L)	Substrato (g/L)	Etanol (g/L)
0,0505	1,817	0,00	74,16
0,0583	2,070	1,72	74,01
0,0879	2,147	30,33	77,18
0,106	2,713	15,25	68,85
0,133	2,803	14,88	65,80
0,174	3,001	74,21	56,10
0,178	3,289	23,81	62,93
0,182	3,451	30,22	62,20
0,236	3,325	40,57	55,64
0,205	3,428	32,93	58,19